

Der Einfluss des Hypoxie-induzierbaren Faktor-1 in myeloischen Zellen auf entzündliche Darmerkrankungen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.

der Fakultät für
Biologie
an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Veronika Natalie Reichmann
aus Gelsenkirchen-Buer

Januar 2016

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Physiologie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. J. Fandrey
2. Gutachter: Prof. Dr. A. Vortkamp

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. A. Westendorf

Tag der mündlichen Prüfung: 03.06.2016

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	5
1.1	Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED).....	5
1.1.1	Aufbau des Magen-Darm-Trakts.....	6
1.1.2	Barrierefunktionen	7
1.1.3	Genetische Prädisposition	8
1.1.4	Murine Tiermodelle zur Untersuchung von CED	9
1.2	Immunsystem.....	10
1.2.1	Murines Immunsystem des Darms.....	11
1.2.2	Immunsystem und CED.....	14
1.3	Hypoxie und Hypoxie-induzierbare Faktoren (HIF).....	15
1.3.1	Aufbau und Regulation von HIF	15
1.3.2	HIF und Entzündungen.....	17
1.3.3	HIF in Immunzellen.....	19
1.4	Zielsetzung.....	21
2	Material	22
2.1	Versuchstiere	22
2.2	Geräte.....	22
2.3	Material	24
2.4	Chemikalien, Reagenzien, Puffer und Lösungen.....	25
2.5	Antikörper	30
2.6	Oligonukleotide	31
3	Methoden.....	33
3.1	Tierversuche	33
3.1.1	DSS-Versuch.....	33
3.1.2	Gewebeentnahme	33
3.2	Zellkultur	34
3.3	RNA, cDNA und PCR.....	35
3.3.1	RNA-Isolierung aus Gewebe	35
3.3.2	RNA Isolierung aus Zellkultur	35
3.3.3	cDNA-Synthese	36
3.3.4	Polymerase-Kettenreaktion	37
3.3.5	Quantitative PCR (qPCR)	38
3.4	Proteine und Western Blot	38
3.4.1	Proteinbestimmung nach Lowry.....	38
3.4.2	SDS-Page	39
3.4.3	Western Blot.....	39
3.5	Histologische Methoden	40
3.5.1	Gewebevorbereitung	40
3.5.2	Hämatoxylin/Eosin-Färbung.....	40

3.5.2.1	Beurteilung der Colon Schädigung	41
3.5.3	Hypoxyprobe-Färbung	41
3.5.4	HIF-1 α -Färbung	42
3.5.5	F4/80-Färbung	43
3.5.6	Alcianblau-Färbung	43
3.5.7	Siriusrot-Färbung	43
3.5.8	Fluoreszenz-Färbung	44
3.6	Mikroskop	44
3.7	Statistische Auswertung	45
4	Ergebnisse.....	46
4.1	Verifizierung des Verlusts von HIF-1 α in Makrophagen der Versuchstiere	46
4.2	Krankheitsbild der DSS-induzierten Colitis	47
4.2.1	Induktion einer Colitis nach Behandlung mit 2,5 % DSS	47
4.2.2	Milz-Struktur nach Induktion einer Colitis mit 2,5 % DSS	50
4.2.3	Auswirkung der DSS-Behandlung auf das Colon	51
4.3	Hypoxie und HIF-1 im Colon der DSS-induzierten Colitis	57
4.4	Reaktion auf die DSS-Behandlung	59
4.4.1	Mucine des Colons während DSS-induzierter Colitis	59
4.4.2	Immunzellen im Colon während DSS-induzierter Colitis	64
4.4.3	Zytokin-Expression im Colon nach DSS-Behandlung	75
4.4.4	Immunzellen in mesenterischen Lymphknoten während DSS-induzierter Colitis	80
5	Diskussion.....	83
5.1	Milderes Krankheitsbild der DSS-induzierten Colitis ohne myeloisches HIF-1 α	83
5.2	Protektive Rolle von Mucinen bei CED und ihre Abhängigkeit von HIF-1 α	85
5.3	Zunahme von Hypoxie und HIF-1 α -Akkumulation während CED	86
5.4	Reduzierter Schweregrad der DSS-induzierten Colitis aufgrund verminderter Immunzellrekrutierung.....	87
5.5	Das adaptive Immunsystem während CED	91
5.6	HIF-1 als therapeutischer Angriffspunkt während CED	94
6	Zusammenfassung	96
7	Abstract	98
8	Literaturverzeichnis	100
9	Anhang	112
9.1	Abkürzungsverzeichnis	112
9.2	Abbildungsverzeichnis	116
9.3	Tabellenverzeichnis	117
9.4	Publikationsliste	118
9.5	Lebenslauf	120
9.6	Danksagung.....	121

1 Einleitung

1.1 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED)

Die Zahl der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) nimmt vor allem in Nordeuropa kontinuierlich zu. In Deutschland waren 2010 ungefähr 420.000-470.000 Menschen betroffen (Stallmach et al., 2012). Dabei sind CED durch rezidivierende oder kontinuierliche entzündliche Erkrankungen vornehmlich des Darms charakterisiert. Die häufigsten Formen sind Colitis Ulcerosa (CU) und Morbus Crohn (MC). Bei beiden Erkrankungen kommt es schubartig zu Beschwerden wie zum Teil blutigen Durchfällen, Bauchschmerzen, Fieber, Übelkeit und erhöhten Entzündungswerten im Blut. Die Beschwerden der Krankheitsschübe lassen sich durch medikamentöse Behandlung und eine Anpassung der Lebensgewohnheiten reduzieren, allerdings gibt es bisher noch keine Möglichkeit der Heilung. Patienten mit CED zeigen ein erhöhtes Risiko für Darmkrebs, welches je nach Ausmaß und Dauer der Krankheitsschübe steigt (van Hogezaand et al., 2002).

Die genauen Ursachen der CED sind derzeit noch unbekannt. Man geht jedoch von einem multifaktoriellen Zusammenspiel zwischen genetischer Prädisposition und dem Einfluss von Umweltfaktoren aus. Als Mechanismus wird eine ungewöhnlich starke Abwehrreaktion des eigenen angeborenen und adaptiven Immunsystems gegen Bestandteile der Darmwand und die intestinale Mikrobiota vermutet (siehe Abbildung 1.1). Diese gestörte Immunantwort verursacht Defekte in der epithelialen Barrierefunktion und der epithelialen Pathogenantwort (Coskun, 2014).

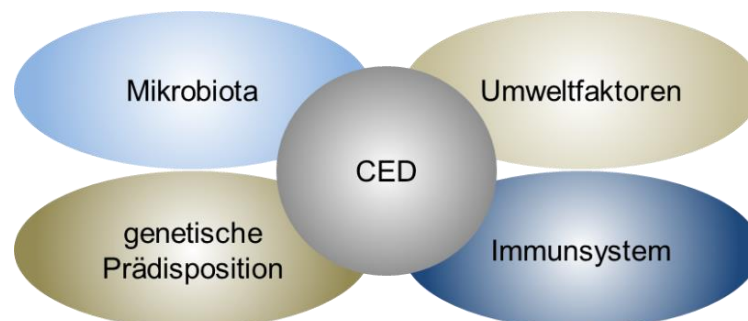


Abbildung 1.1 Ursachen der CED: Als Ursachen für CED wird ein multifaktorielles Zusammenspiel zwischen genetischer Prädisposition und Umweltfaktoren vermutet. Folgend kommt es zu gestörter Reaktion des Immunsystems auf die eigene Mikrobiota und Bestandteile der Darmwand (verändert nach Sartor, 2006).

1.1.1 Aufbau des Magen-Darm-Trakts

Der Magen-Darm-Trakt dient der Aufnahme, der Verdauung und dem Weitertransport der Nahrung und wird in folgende Abschnitte unterteilt: 1. Magen (*Gaster*); 2. Zwölffingerdarm (*Duodenum*); 3. Leerdarm (*Jejunum*); 4. Krummdarm (*Ileum*); 5. Blinddarm (*Caecum*); 6. Grimmdarm (*Colon*); und 7. Mastdarm (*Rectum*). Das Colon wird wiederum in *Colon ascendens*, *Colon transversum*, *Colon descendens* und *Colon sigmoideum* unterteilt (Zilles & Tillmann, 2010) (siehe Abbildung 1.2 A).

MC betrifft meist das Ileum und Colon, kann aber, meist diskontinuierlich, in allen Abschnitten des Magen-Darm-Trakts auftreten. CU hingegen ist auf das Rectum und das Colon beschränkt. Hier kann es zu einer durchgängigen Schädigung des gesamten Colons (Pankolitis) oder zur Schädigung von Teilen des Colons kommen (Abraham & Cho, 2009) (siehe Abbildung 1.3 A).

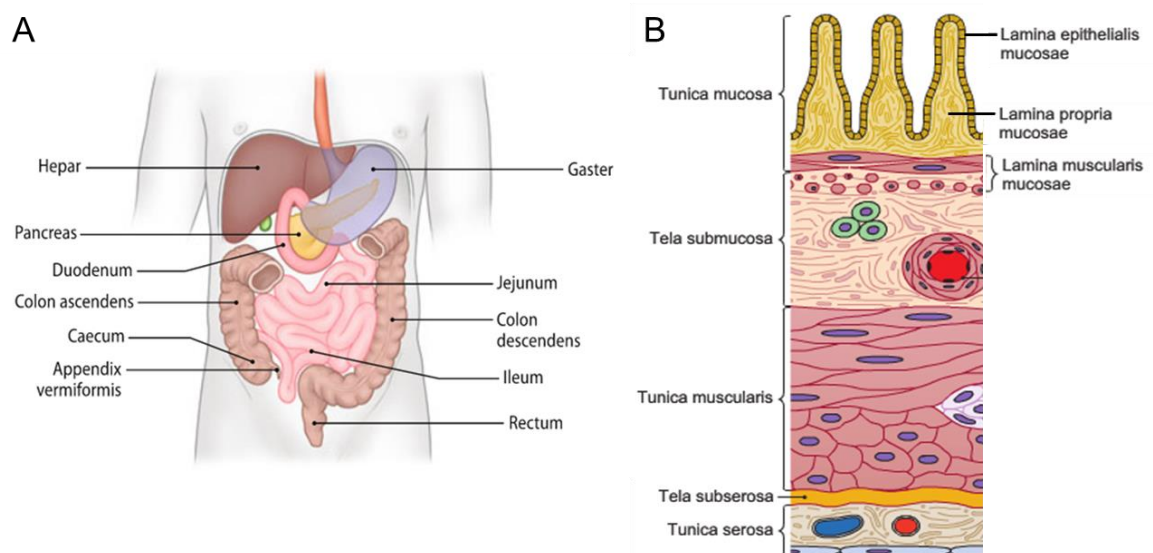


Abbildung 1.2 Aufbau des Magen-Darm-Trakts und der Darmwand: Dargestellt sind die verschiedenen Abschnitte des Magen-Darm-Trakts (A) und der Aufbau der Darmwand (B) (verändert nach Wennemuth, 2012; Zilles & Tillmann, 2010).

Der Magen-Darm-Trakt wird durch eine Schleimhaut, die *Tunica mucosa*, ausgekleidet. Diese ist in allen Magen-Darm-Abschnitten zu finden und umfasst ein einschichtiges Epithel, die *Lamina epithelialis mucosae*, ein subepitheliales Bindegewebe, die *Lamina propria mucosae*, und eine Schicht glatter Muskelzellen, die *Lamina muscularis mucosae*. Die *Lamina propria mucosae* kann weiterhin Kapillaren, Nerven, Lymphgefäße und Zellen des Immunsystems beinhalten. Der *Tunica mucosa* folgt die *Tela submucosa*, welche durch große Blut- und

Lymphgefäße sowie Nerven und Ganglien gekennzeichnet ist. Anschließend folgen die aus Muskelzellen bestehende *Tunica muscularis*, die bindegewebige *Tela subserosa* und die mehrschichtige *Tunica serosa* (Zilles & Tillmann, 2010) (siehe Abbildung 1.2 B).

CU betrifft ausschließlich die *Tunica mucosa*, MC jedoch führt zu transmuralen Schäden in allen Schichten der Darmwand (Abraham & Cho, 2009) (siehe Abbildung 1.3 B).

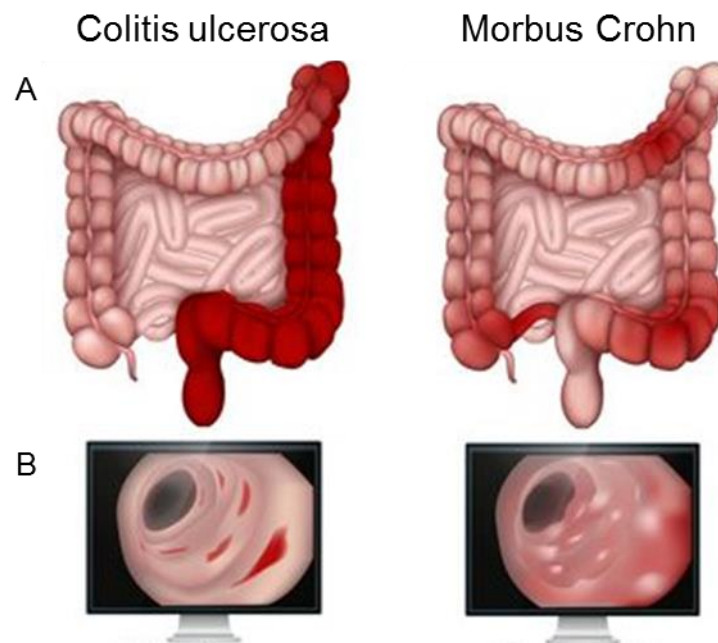


Abbildung 1.3 Colitis ulcerosa und Morbus Crohn im Vergleich: Colitis Ulcerosa betrifft das Rektum und Colon, wohingegen Morbus Crohn im gesamten Magen-Darm-Trakt auftreten kann (A). Die Schädigung ist bei Colitis Ulcerosa auf die *Tunica mucosa* beschränkt, bei Morbus Crohn kann diese jedoch transmural alle Schichten der Darmwand umfassen (B) (verändert nach Gumpert, 2015).

1.1.2 Barrierefunktionen

Der menschliche Magen-Darm-Trakt besitzt vier Barrieren zur Abwehr der intestinalen Mikrobiota. Die erste Barriere bilden Glykoproteine, sogenannte Mucine. Diese kleiden in zwei Schichten, einer lockeren äußeren und einer fest mit dem Epithel verbundenen inneren, das Darmlumen aus und separieren die luminalen Mikrobiota von den Epithelzellen (Hansson, 2012). Der *Knock-out* von *muc-2*, dem am häufigsten sezernierten Mucin des Darmepithels, führt in Mäusen zu einer verminderten Mucusschicht, einer erhöhten Expression von pro-

inflammatorischen Zytokinen und der spontanen Ausbildung einer Colitis (Van der Sluis et al., 2006).

Die zweite schützende Barriere bildet das intestinale Epithel, welches selektiv permeabel ist und Nährstoffe absorbiert. Intestinale Epithelzellen erhalten die intestinale Homöostase, indem sie das Darmlumen von der *Lamina propria mucosae* trennen und so die Kommunikation der intestinalen Mikrobiota mit dem Immunsystem kontrollieren. Die parazelluläre Permeabilität und Barriereintegrität wird dabei von *tight junctions* reguliert, welche die intestinalen Epithelzellen fest miteinander verbinden und gleichzeitig eine Diffusionsbarriere bilden. Veränderte Expression und Struktur intestinaler *tight junctions* sind eng mit der Entstehung von CED verbunden (Zeissig et al., 2007). Pro-inflammatorische Zytokine, wie der Tumornekrosefaktor α (TNF α), können die Permeabilität von *tight junctions* erhöhen, weshalb Patienten auf eine anti-TNF α -Therapie mit wiederhergestellter intestinaler Permeabilität reagieren (Suenart et al., 2002). Außerdem ist die Apoptoserate intestinaler Epithelzellen während CED erhöht, was die Barriereintegrität ebenfalls beeinflusst (Salim & Söderholm, 2011). Die Verabreichung des Hydroxylase-Inhibitors Dimethyloxallylglycin (DMOG) wirkt antiapoptotisch auf diese Zellen und führt somit zu einer Verbesserung der Barriereintegrität und zu einer abgemilderten Colitis im Tiermodell (Cummins et al., 2008).

Die dritte und vierte schützende Barriere bilden residente und rekrutierbare Zellen des Immunsystems, welche eingedrungene Pathogene erkennen und zerstören (Hansson, 2012), siehe auch Abschnitte 1.2.1 und 1.2.2.

1.1.3 Genetische Prädisposition

Das Wissen über genetische Faktoren der CED wurde aufgrund neuer technologischer Möglichkeiten in den letzten Jahrzehnten immer größer. Mutationen in Genen, die in beiden Krankheitsbildern vorzufinden sind, betreffen: 1. Zytokine, 2. Transkriptionsfaktoren und 3. die Leukozyten-Bewegung (Cho & Brant, 2011).

Ausschließlich CU-assoziierte Gendefekte betreffen: 1. die Barrierefunktion des Epithels, 2. die Funktion des Haupthistokompatibilitätskomplexes II (MHCII, engl. *major histocompatibility complex*), 3. Proteine der Leukozyten-Rekrutierung und -

Extravasation, 4. die Phagozytoseaktivität von Neutrophilen und Makrophagen, 5. Apoptose und Autophagozytose, sowie 6. die Differenzierung von Th1- und Th17-Zellen (Anderson et al., 2011; Danese & Fiocchi, 2011).

1.1.4 Murine Tiermodelle zur Untersuchung von CED

Zur Untersuchung von CED gibt es eine Vielzahl von Tiermodellen, die meisten davon für den Modellorganismus Maus. Es wurden genetisch bedingte, Bakterien-induzierte und chemisch induzierte CED-Modelle etabliert. Bei den genetisch bedingten CED-Modellen kommt es meist zur Ausbildung einer spontanen Colitis aufgrund von fehlerhafter Pathogenabwehr und -antwort. So führt z.B. der *Knock-out* von *interleukin 10 (il-10)* bei Mäusen in einem Alter von 2-3 Monaten zu einer Entzündung des gesamten Colons, welche mit dem humanen MC-Krankheitsbild vergleichbar ist (Rennick et al., 1997).

Bei der Bakterien-induzierten CED, z.B. durch die orale Verabreichung von *Salmonella typhimurium*, kommt es zuerst zu einer systemischen Infektion, die nach 5-7 Tagen auch zu einer intestinalen Entzündung mit Verlust der epithelialen Krypten, zu Ulzeration in der Epithelschicht und der Infiltration von Neutrophilen führt. Dies ist vergleichbar mit dem Verlauf der humanen CU (Barthel et al., 2003).

Bei den chemisch induzierten CED-Modellen sind vor allem die Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS)- und die Dextrannatrium-Sulfat (DSS, engl. *dextran sulfate sodium*)-induzierte Colitis zu nennen. Erstere dient als Modell für beide Formen der CED. In Ethanol gelöstes TNBS wird einmalig intrarektal verabreicht. Dabei beeinträchtigt Ethanol die Barriereintegrität, so dass TNBS kovalent an Lysine der *Tunica mucosa* bindet, Zelloberflächenproteine modifiziert und eine Colitis induziert (Neurath et al., 1995). Ein Nachteil dieses Modells ist die Verwendung von Ethanol, welches allein zu Entzündungen der *Tunica mucosa* führt.

Die DSS-induzierte Colitis ist das am häufigsten eingesetzte Tiermodell zur Untersuchung von CED und kann sowohl zur Untersuchung des akuten als auch des chronischen CU-Krankheitsbilds verwendet werden. DSS wird über das Trinkwasser verabreicht und ermöglicht durch die chemische Zerstörung der *Tunica mucosa* das Eindringen luminaler Pathogene, was letztendlich zur Entzündung führt (Okayasu et al., 1990).

1.2 Immunsystem

Die ersten Barrieren unseres Körpers, welche das Eindringen von Pathogenen verhindern, sind Haut und Schleimhäute. Eindringene Pathogene und entartete körpereigene Zellen werden mit Hilfe des Immunsystems eliminiert. Dabei unterscheidet man zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort.

Zum angeborenen Immunsystem gehören unter anderem neutrophile Granulozyten (Neutrophile), Makrophagen und dendritische Zellen (DC, engl. *dendritic cells*). Diese Phagozyten gehen aus den gleichen myeloischen Vorläuferzellen hervor (siehe Abbildung 1.4).

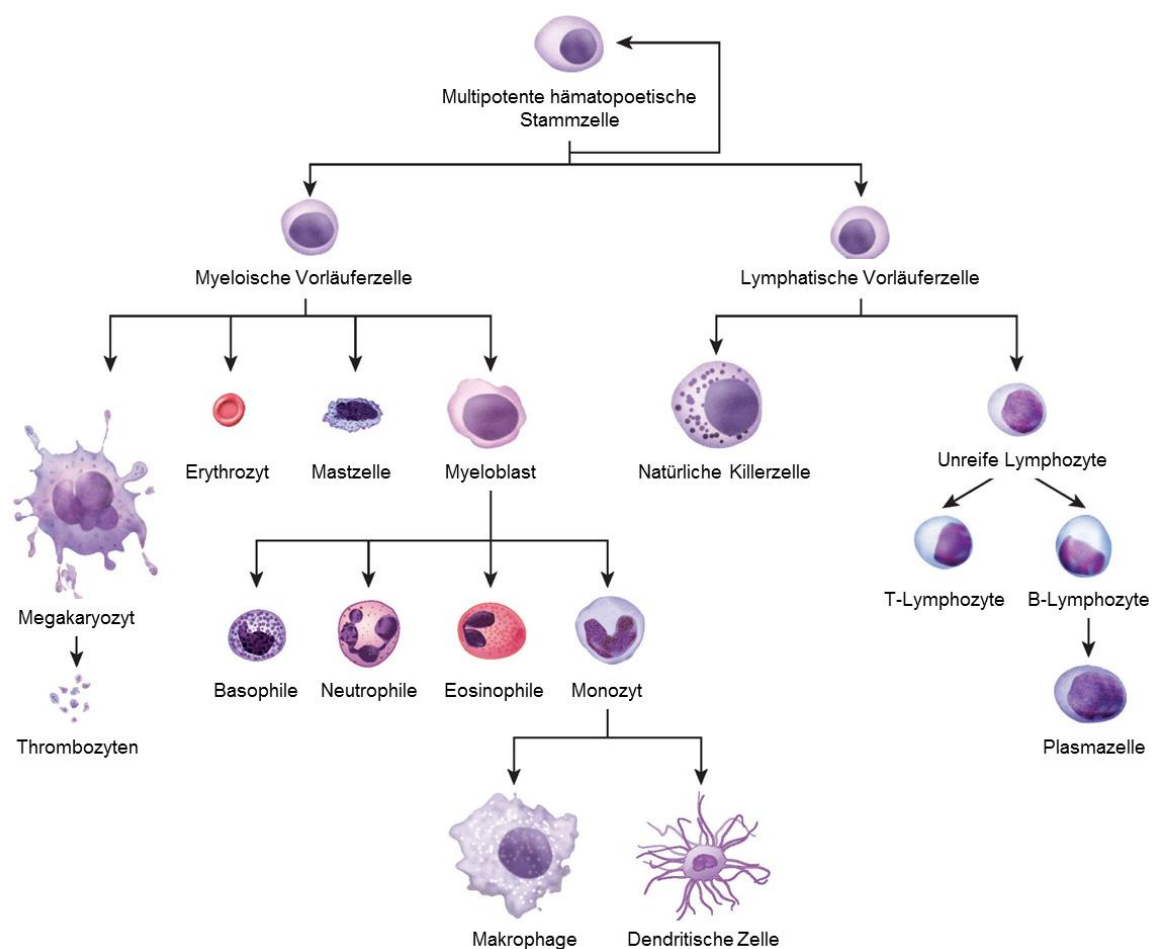


Abbildung 1.4 Differenzierung der Immunzellen: Dargestellt ist die Hämatopoese der Immunzellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems. Deutlich zu erkennen ist der gemeinsame myeloische Ursprung von Neutrophilen, Makrophagen und dendritischen Zellen (verändert nach Open Stax College, 2013).

Phagozyten können mit Mustererkennungsrezeptoren (PRR, engl. *pattern recognition receptors*) pathogenassoziierte molekulare Muster (PAMP, engl. *pathogen-associated molecular patterns*) wahrnehmen, welche auf vielen Mikroorganismen, jedoch nicht auf körpereigenen Zellen, vorkommen. Kommt es

zur Bindung an diese Rezeptoren, wird die Phagozytose und Zerstörung des Pathogens eingeleitet. Während der Phagozytose erzeugen Neutrophile und Makrophagen Substanzen wie Stickstoffmonooxid (NO^\cdot), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und das Superoxidanion ($\text{O}_2^{\cdot-}$), welche direkt toxisch für Bakterien sind. Das Superoxidanion wird während des sogenannten *respiratory burst* erzeugt, wobei der Sauerstoffverbrauch vorübergehend stark zunimmt, wodurch es zu Hypoxie (Sauerstoffmangel) kommen kann.

Makrophagen und DC bilden eine Verbindung zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort. Auf der einen Seite sezernieren sie Zytokine, welche die adaptive Immunantwort beeinflussen, auf der anderen Seite können sie phagozytierte Pathogene prozessieren und Bruchstücke von ihnen als Antigene auf ihrer Zelloberfläche präsentieren und dadurch Zellen der adaptiven Immunantwort aktivieren. Aufgrund dieser Eigenschaft werden sie auch antigenpräsentierende Zellen (APC, engl. *antigen presenting cells*) genannt.

Das adaptive Immunsystem besteht aus Lymphozyten, bei denen B- und T-Zellen unterschieden werden (Schütt & Bröker, 2009). Vor einer ersten Antigenpräsentation durch eine APC werden sie unreife Lymphozyten genannt (siehe Abbildung 1.4).

Nach Aktivierung durch Präsentation eines Antigens differenzieren B-Zellen zu Plasmazellen und sezernieren Immunglobuline (Ig). T-Zellen differenzieren nach Aktivierung zu einer von drei Typen von T-Effektorlymphozyten: 1. zytotoxische T-Zellen, welche Pathogene töten, 2. T-Helferzellen (Th), welche bei der Aktivierung von B-Zellen mitwirken und 3. regulatorische T-Zellen (T_{reg}), die die Aktivität anderer Immunzellen unterdrücken (Murphy et al., 2009). Bei den Th unterscheidet man weiterhin drei Untergruppen: 1. Th1 produzieren Interferon γ ($\text{IFN}\gamma$) und $\text{TNF}\alpha$, wobei $\text{IFN}\gamma$ Makrophagen zu weiterer $\text{TNF}\alpha$ -Ausschüttung stimuliert, 2. Th2 sezernieren IL-13, welches die intestinale Permeabilität erhöht und Apoptose intestinaler Epithelzellen induziert, 3. Th17 schütten IL-17A zur Neutrophilen-Rekrutierung und IL-21 zur Induktion von Matrix-Metalloproteinasen (MMP) aus (Wallace et al., 2014).

1.2.1 Murines Immunsystem des Darms

Das intestinale Immunsystem ist dauerhaft einer Vielzahl von intestinalen Bakterien und Antigenen ausgesetzt, muss zwischen harmlosen und pathogenen

Anteilen unterscheiden und eine angemessene, das heißt tolerante oder aktive, Pathogenantwort auslösen (Xavier & Podolsky, 2007). Zu diesem Zweck besitzt das intestinale Immunsystem neben APC weitere Strukturen, die die luminalen Mikrobiota ständig überwachen, das sogenannte GALT (engl. *gut-associated lymphoid tissue*). Zum GALT gehören unter anderem spezialisierte Epithelzellen, sogenannte M-Zellen, welche Makromoleküle, IgA Komplexe und Pathogene über Pinozytose aus dem Lumen zu APC transportieren. Peyer-Plaques und mesenteriale Lymphknoten gehören zu den sekundären lymphatischen Organen, wo Antigenpräsentation stattfindet. Sobald B- und T-Zellen in den Peyer-Plaques aktiviert werden, erhöhen diese ihre Proteinbiosynthese von $\alpha 4\beta 7$ -Integrin und migrieren über das Blut in die *Lamina propria mucosae*. Die Feinabstimmung dieser zielgerichteten Rekrutierung erfolgt über Chemokine, die von Epithelzellen des Colons ausgeschüttet werden (Campbell et al., 2003; Mann & Li, 2014) (siehe Abbildung 1.5).

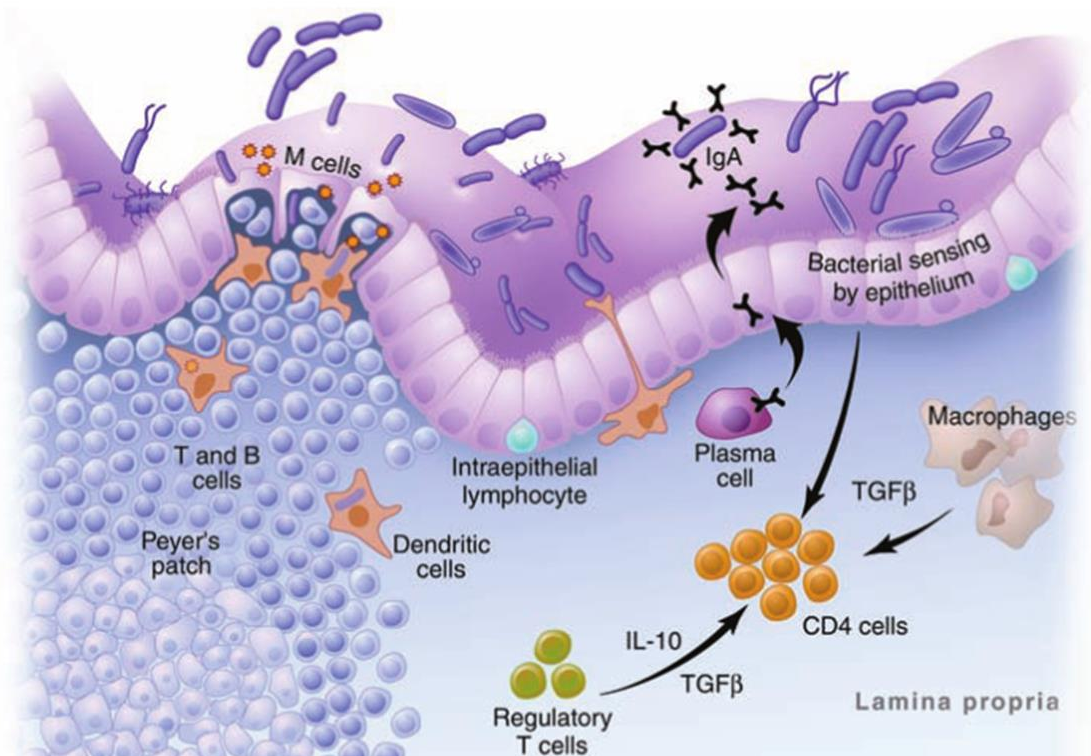


Abbildung 1.5 Immunsystem des Darms: Das GALT besitzt spezialisierte M-Zellen, welche Antigene aus dem Lumen zu APC der lymphatischen Gewebe, wie Peyer Plaques, transportieren und dort zur Aktivierung von B- und T-Zellen führen. DC der *Lamina propria mucosae* können transepithelial Antigenkontakt aufnehmen. Weitere Immunzellen wie verschiedene Subtypen von T-Zellen, Plasmazellen und Makrophagen schütten Zytokine wie IL-10 und TGFβ aus (Macdonald & Monteleone, 2005).

Auch die zielgerichtete Rekrutierung von weiteren Immunzellen des angeborenen Immunsystems wie Neutrophilen, Makrophagen und DC, in die *Lamina propria mucosae* ist abhängig von verschiedenen Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen und wird durch Integrine, Chemokinrezeptoren und mikrobielle Signale koordiniert (Xavier & Podolsky, 2007). So schütten residente Makrophagen der *Lamina propria mucosae* nach Pathogenkontakt IL-1 β und TNF α aus, welche chemotaktisch für Neutrophile wirken. Nach Anheftung der Neutrophilen an vaskuläre Endothelzellen und Transmigration kommt es zur Rekrutierung von Neutrophilen in die *Lamina propria mucosae* (Kolaczowska & Kubes, 2013).

Weitere Immunzellen der *Lamina propria mucosae* sind CD4⁺ T-Zellen, CD8⁺ T-Zellen, T_{reg}, Makrophagen, IgA-Antikörper-produzierende Plasmazellen und DC (Macdonald & Monteleone, 2005). DC formen hierbei ein komplexes subepitheliales Netzwerk und können transepithelial Antigenkontakt aufnehmen (Xavier & Podolsky, 2007) (siehe Abbildung 1.5). In den letzten Jahren ist die Rolle der T_{reg} für die anti-inflammatorische Antwort des intestinalen Immunsystems auf die Mikrobiota immer deutlicher geworden. Eine wichtige Rolle spielen dabei die Zytokine IL-10 und der transformierende Wachstumsfaktor β (TGF β , engl. *transforming growth factor β*) (Valencia et al., 2006). In der *Tunica mucosa* von CED-Patienten konnte ein gestörter TGF β -Signalweg nachgewiesen werden (Monteleone et al., 2001). Außerdem zeigten TGF β -induzierte T_{reg} im Tiermodell für Colitis protektive Wirkung (Fantini et al., 2006).

Den größten Anteil der intestinalen Immunzellen bilden jedoch Makrophagen. Obwohl diese eine starke Phagozytoseaktivität aufweisen, leiten sie dennoch keine pro-inflammatorische Reaktion ein (Bain et al., 2013), zeigen keinen *respiratory burst* (Rugtveit et al., 1995) und bilden kein NO[•] (Roberts et al., 2001) wie Makrophagen in anderen Geweben. Sie sind des Weiteren maßgeblich an der Erhaltung der epithelialen Barriereintegrität durch die Sekretion von Prostaglandin E2 beteiligt, wodurch die Proliferation und das Überleben von epithelialen Vorläuferzellen gefördert wird (Pull et al., 2005). Sie produzieren zudem große Mengen IL-10, welches TLR-vermittelte Stimuli blockiert, Entzündungen verhindert (Ueda et al., 2010) und zusätzlich das Überleben und die Funktion von T_{reg} der *Tunica mucosa* fördert (Murai et al., 2009).

1.2.2 Immunsystem und CED

CED führen charakteristischerweise zu einer massiven Akkumulation von Neutrophilen, Makrophagen und DC in intestinalem Gewebe, welche durch die erhöhte Präsentation von $\alpha 4\beta 7$ -Integrin und CCR9 auf der Immunzelloberfläche und von Adhäsionsmolekülen auf vaskulären Endothelzellen vermittelt wird. Unter anderem wird dies durch das erhöhte Aufkommen von Zytokinen, wie TNF α und IL-1 β , begünstigt (Mora et al., 2003). Therapeutische Behandlung mit dem $\alpha 4\beta 7$ -Antikörper Vedolizumab oder dem $\beta 7$ -Antikörper Etrolizumab führt zu verringerter Leukozyten-Rekrutierung und somit zu einem abgemilderten Krankheitsverlauf von CED (Feagan et al., 2005; Rutgeerts et al., 2013).

Der aktuelle wissenschaftliche Stand zum Einfluss von Neutrophilen während CED ist kontrovers. So konnten mehrere Studien eine Verbesserung der DSS- oder TNBS-induzierten Colitis nach Neutrophilen-Depletion beobachten (Buell & Berin, 1994; Natsui et al., 1997), wohingegen in anderen Studien eine Neutrophilen-Depletion die DSS- oder TNBS-induzierte Colitis deutlich verstärkte (Kühl et al., 2007; Zhang et al., 2011). Eine weitere Studie konnte wiederum zeigen, dass eine Depletion von Makrophagen und DC zu einer erhöhten Neutrophilen-Akkumulation und einem verstärkten Krankheitsverlauf der DSS-induzierten Colitis führte, welche durch zusätzliche Depletion von Neutrophilen wieder normalisiert werden konnte (Qualls et al., 2006).

Ende des 20. Jahrhunderts wurde zum ersten Mal eine veränderte Zytokin-Ausschüttung durch intestinale Immunzellen in CED-Patienten nachgewiesen. In anschließenden Untersuchungen führte z.B. der Zell-spezifische *Knock-out* des IL-10-Rezeptors auf Makrophagen zur Ausbildung einer spontanen Colitis in Mäusen (Zigmond et al., 2014) und die Blockierung des IL-6-Signalwegs zu einer abgemilderten Form im CED-Mausmodell, sowie in ersten klinischen Studien bei MC-Patienten (Atreya et al., 2000; Ito et al., 2004).

Des Weiteren konnte in Patienten mit CED ein Missverhältnis der Untergruppen der T-Effektorlymphozyten festgestellt werden (Fujino et al., 2003; Kobayashi et al., 2008). Besondere Beachtung findet in neuesten Studien das Verhältnis von Th17 zu T_{reg}, welches entscheidenden Einfluss auf die Unterdrückung bzw. Begünstigung von Entzündungen hat (Catana et al., 2015). In Mausexperimenten wurde außerdem gezeigt, dass eine gestörte T_{reg}-Entwicklung und -Funktion zu Darmentzündungen führen kann (Mottet et al., 2003; Powrie et al., 1993).

1.3 Hypoxie und Hypoxie-induzierbare Faktoren (HIF)

Die Regulation der Sauerstoffhomöostase ist eine überlebenswichtige Funktion aller Vertebraten. Nicht nur bei Höhengaufenthalt überschreitet der Bedarf an Sauerstoff (O_2) das Angebot und es kommt zu Sauerstoffmangel (Hypoxie) (Fandrey, 2007), sondern auch entzündliches oder erkranktes Gewebe kann hypoxisch werden. Hier entsteht aufgrund der Schädigung der Blutgefäße, erhöhter metabolischer Aktivität durch Pathogene und einer erhöhten Zahl infiltrierter Immunzellen ein verstärkter Sauerstoffverbrauch (Karhausen et al., 2005). Im Darm hingegen ist eine physiologische Gewebe-Hypoxie vorzufinden. Hier herrscht ein starker Sauerstoffgradient zwischen dem anoxischen Darmlumen und dem stark durchbluteten Darmgewebe (Furuta et al., 2001; Taylor & Colgan, 2007).

Die zelluläre Adaptation an Sauerstoffmangel ist in weiten Teilen abhängig von den Proteinen der Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIF). Diese Transkriptionsfaktoren regulieren die Genexpression von mehr als 100 Zielgenen unter Sauerstoffmangelbedingungen. Diese Gene sind unter anderem beteiligt an Glykolyse, Erythropoiese und Angiogenese, wodurch das Gewebe an die veränderten Sauerstoffbedingungen angepasst wird (Fandrey, 2004; Semenza, 1998).

1.3.1 Aufbau und Regulation von HIF

HIF ist ein Heterodimer, welches aus einer konstitutiv exprimierten HIF- β Untereinheit und einer O_2 -regulierten HIF- α Untereinheit besteht (Wang et al., 1995). Bisher sind drei HIF- α Isoformen bekannt (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α), von denen HIF-1 α und HIF-2 α im Dimer mit HIF- β als Transkriptionsaktivatoren fungieren (Carroll & Ashcroft, 2006). Die Funktion von HIF-3 α ist bisher noch nicht genau geklärt, jedoch gibt es Hinweise auf negativ regulierende Funktion (Makino et al., 2001).

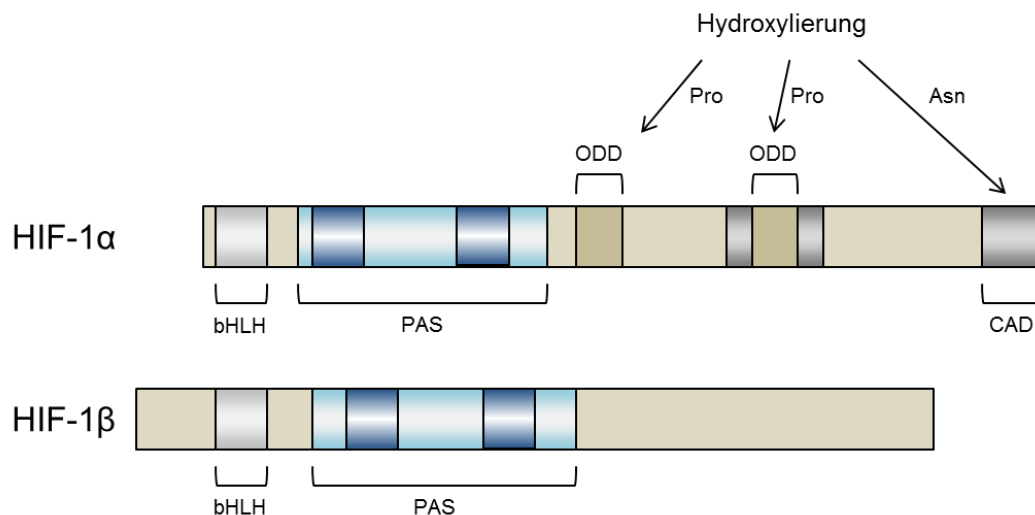


Abbildung 1.6 Domänenstruktur von HIF-1α und HIF-1β: HIF-1α und HIF-1β weisen eine bHLH-Domäne zur Bindung an die HRE der DNA und eine PAS-Domäne zur Dimerisierung auf. Zusätzlich verfügt nur HIF-1α über die O₂-sensitiven Strukturen ODD und CAD (verändert nach Schofield & Ratcliffe, 2004).

Alle drei Isoformen sind charakterisiert durch eine bHLH-Domäne, welche an die Hypoxie-responsiven Elemente (HRE) der DNA bindet, eine PAS-Domäne, welche der Dimerisierung von HIF-α mit HIF-β dient, und einer O₂-sensitiven Abbau-Domäne (ODD, engl. *oxygen-dependent degradation*), in welcher zwei Proline liegen, die in Anwesenheit von O₂ hydroxyliert werden und somit zum Abbau von HIF-α führen. Nur HIF-1α und HIF-2α verfügen zusätzlich noch über eine CAD-Domäne, in der ein Asparagin zur Bindung von Co-Aktivatoren der Transkription dient (Fandrey et al., 2006) (siehe Abbildung 1.6).

In Anwesenheit von O₂ werden die HIF-α Untereinheiten im Proteasom abgebaut. Hierzu werden die Proline der ODD-Domäne durch Hydroxylasen markiert, diese werden anschließend durch den von-Hippel-Lindau-Faktor (pVHL) erkannt und ubiquitinyliert. Die entstandenen Polyubiquitin-OH-HIF-α Untereinheiten können dann im Proteasom abgebaut werden (Ivan et al., 2001). Bisher sind drei Prolylhydroxylasen (PHD1, PHD2, PHD3) bekannt (Bruick & McKnight, 2001). Auch das Asparagin der CAD-Domäne unterliegt O₂-abhängiger Modifikation. Eine Asparagylhydroxylase, auch FIH (engl. *Factor Inhibiting HIF*) genannt, hydroxyliert das Asparagin, sodass dieses keine Co-Aktivatoren mehr rekrutieren kann (Lando et al., 2002) (siehe Abbildung 1.7, links).

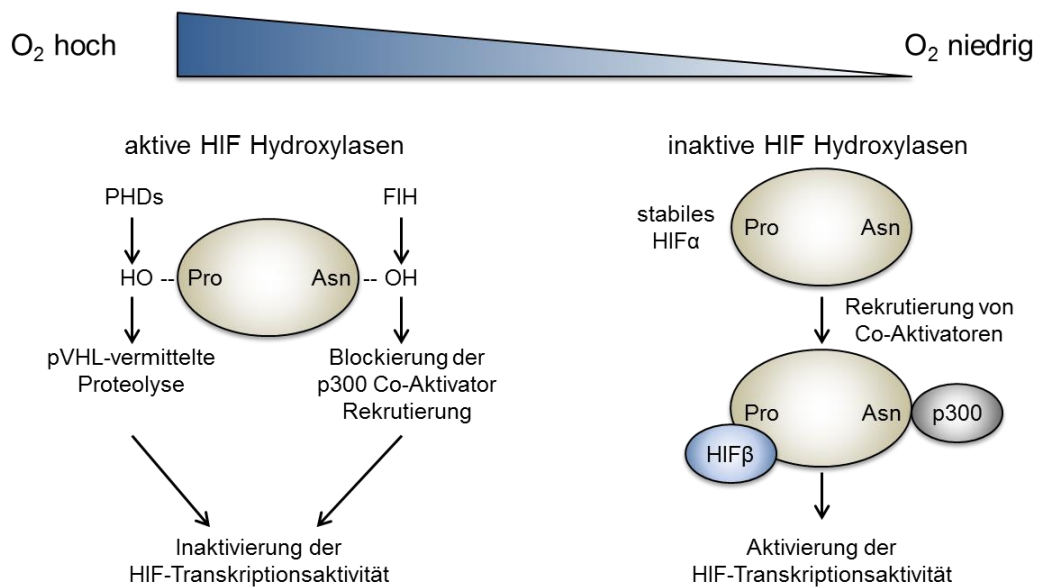


Abbildung 1.7 Regulation der HIF- α Untereinheit durch PHDs und FIH: In Anwesenheit von O_2 sind PHDs und FIH aktiv, hydroxylieren Prolin (Pro)- und Asparagin (Asn)-Reste der HIF- α Untereinheit und führen zu pVHL-vermittelter Proteolyse und Blockierung der Co-Aktivator-Rekrutierung. Bei O_2 -Mangel sind die Hydroxylasen inaktiv und HIF- α dimerisiert mit HIF- β . Es kommt zur Bindung von Co-Aktivatoren und somit zur Transkription von Zielgenen (verändert nach Schofield & Ratcliffe, 2004).

Unter hypoxischen Bedingungen sind die PHDs inaktiv oder zumindest in ihrer Aktivität vermindert, da sie O_2 als Co-Faktor benötigen. HIF- α ist somit stabil und kann mit HIF- β ein Heterodimer bilden, in den Nukleus translozieren und an die HRE der DNA binden (Fandrey, 2004). Auch die Aktivität von FIH ist O_2 -abhängig, sodass während einer Hypoxie keine Hydroxylierung von Asparagin erfolgt und dieses den Co-Aktivator p300 binden kann (Lando et al., 2002). Das nun aktive HIF- α kann weitere Co-Faktoren und HIF- β rekrutieren, einen Transkriptionskomplex bilden und die Transkription von HIF-Zielgenen initiieren (siehe Abbildung 1.7, rechts).

1.3.2 HIF und Entzündungen

Hypoxie und Entzündungen sind eng miteinander verbunden. Patienten mit Höhenkrankheit, die lange Zeit geringen Sauerstoffbedingungen ausgesetzt waren, zeigten auch erhöhte Expression von inflammatorischen Zytokinen (Hackett & Roach, 2001). Gleichzeitig sind auch viele entzündliche Krankheiten wie rheumatoide Arthritis und CED durch das Auftreten von Hypoxie charakterisiert (Hu et al., 2014; Taylor & Colgan, 2007).

Hypoxie und Entzündung sind des Weiteren auch auf molekularer Ebene miteinander verknüpft. So haben die entsprechend aktiven Transkriptionsfaktoren HIF und NFκB mehrere gemeinsame Regulatoren, Stimuli und Zielgene (Bandarra & Rocha, 2013). Außerdem konnte gezeigt werden, dass NFκB die Expression von *hif-1α* positiv beeinflusst (Frede et al., 2006; van Uden et al., 2008) und HIF-1α entgegengesetzt NFκB negativ reguliert (Bandarra et al., 2014).

Der aktuelle Stand der Wissenschaft beschränkt sich fast ausschließlich auf die Funktion von epitheliale HIF während einer CED. In Epithelzellen gilt eine HIF-1-Aktivität während CED als protektiv, da HIF-1 die Apoptose von Epithelzellen hemmt, die Genexpression von Barriere-schützenden Genen stimuliert und die Apoptose von Neutrophilen fördert (Abraham & Cho, 2009). So konnte die Verabreichung von DMOG, einem Hydroxylase-Hemmer und HIF-Stabilisator, während DSS-induzierter Colitis in Mäusen den Krankheitsverlauf abmildern (Cummins et al., 2008). Auch der globale *Knock-out* von *phd-1* und daraus resultierende HIF-Stabilisierung in Mäusen führte zu einem verbesserten Krankheitsbild der DSS-induzierten Colitis (Tambuwalla et al., 2010).

Der Zell-spezifische *Knock-out* von HIF-1α in Epithelzellen der Maus führte in Experimenten der Arbeitsgruppe von Karhausen et al. zur spontanen Entwicklung einer Colitis (2004), in einer späteren Studie einer anderen Arbeitsgruppe jedoch zu einem verbesserten Krankheitsbild der experimentellen Colitis (Shah et al., 2008). In unserer Arbeitsgruppe führte der *Knock-out* von HIF-1α in DC zu einem verstärkten Krankheitsbild der DSS-induzierten Colitis, welche unter anderem auf eine verminderte T_{reg}-Rekrutierung zurückzuführen war (Flück et al., 2015).

Die genaue Rolle von HIF-2 während Entzündungen ist bisher noch unklar. In CED-Patienten konnte zwar eine erhöhte Expression von *hif-2α* festgestellt werden (Giatromanolaki et al., 2003), jedoch gibt es bisher nur wenige Tiermodelle betreffend CED und HIF-2. So führte der Zell-spezifische *Knock-out* von *hif-2α* in Epithelzellen der Maus zu einer abgemilderten Ausprägung der DSS-induzierten Colitis und die vermehrte Expression von *hif-2α* in Epithelzellen zu einer spontanen Colitis (Xue et al., 2013). Somit würde HIF-2 eine konträre Rolle zu HIF-1 während CED einnehmen. Dies könnte mit dem zeitlichen Auftreten von HIF-1 und HIF-2 während CED zu begründen sein. So konnte HIF-1 in der frühen

Phase der experimentellen Colitis nachgewiesen werden und HIF-2 eher während der späten Phase (Eltzschig et al., 2014). Die Arbeitsgruppe von Imtiyaz et al. konnte in einem DSS-Azoxymethan (AOM)-kombinierten Modell für Darmkrebs eine reduzierte Tumorlast in Mäusen mit einem zellspezifischen *Knock-out* von *hif-2 α* in Makrophagen beobachten. Dies war vor allem mit einer reduzierten Makrophagen-Rekrutierung ins Tumorgewebe verbunden (Imtiyaz et al., 2010).

1.3.3 HIF in Immunzellen

HIF-1 α wird in nahezu jeder Immunzelle des angeborenen sowie adaptiven Immunsystems exprimiert, z.B. in Makrophagen (Cramer et al., 2003), Neutrophilen (Walmsley, Cadwallader et al., 2005) und DC (Jantsch et al., 2008). Die Bedeutung von HIF als Regulator des angeborenen und adaptiven Immunsystems wurde in den letzten Jahren immer deutlicher. So konnte durch gezielten *Knock-out* von *hif-1 α* in Makrophagen, DC, T-Zellen und Neutrophilen, die entscheidende Beteiligung von HIF an der Immunantwort dieser Zellen gezeigt werden (Cramer et al., 2003; Dang et al., 2011; Jantsch et al., 2008; Naldini et al., 2012; Walmsley et al., 2005).

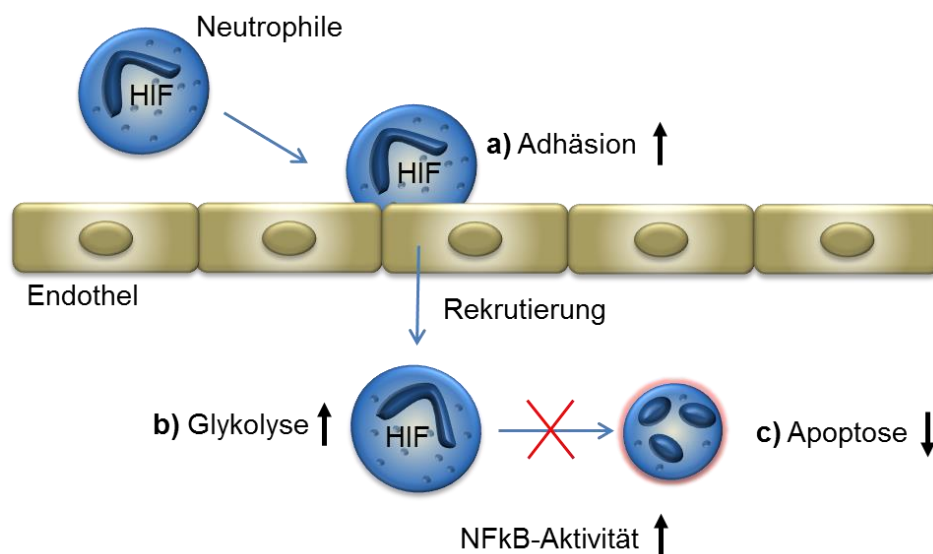


Abbildung 1.8 HIF-Aktivität in Neutrophilen: HIF-Aktivität ist durch verschiedene Mechanismen an der Funktion myeloischer Zellen beteiligt. So führt die HIF-vermittelte Expression von $\beta 2$ -integrin zu erhöhter Adhäsion von Neutrophilen an Endothelzellen und somit zu vermehrter Rekrutierung ins Zielgewebe (a). HIF-regulierte Enzyme der Glykolyse ermöglichen eine vermehrte ATP-Produktion und fördern somit die Aktivität von Neutrophilen (b). Durch HIF-1-bedingte NFκB-Aktivität wird die Apoptose-Rate vermindert und die Lebensdauer von Neutrophilen verlängert (c) (verändert nach Walmsley et al., 2005).

HIF-1 α spielt dabei eine entscheidende Rolle für das Überleben von myeloischen Zellen unter hypoxischen Bedingungen (Walmsley et al., 2005), für die Phagozytoseaktivität von Makrophagen (Cramer et al., 2003), für die Typ I-IFN-Ausschüttung von DC (Wobben et al., 2013), für die Funktion von T_{reg} (Clambey et al., 2012) und für die Expression von $\beta 2$ -*integrin* in Leukozyten (Kong et al., 2004). Neutrophile gehören zu den ersten Zellen der Immunantwort. Ihre gezielte Rekrutierung zu entzündlichem Gewebe beginnt mit der Anheftung an vaskuläre Endothelzellen. HIF-1 reguliert die Expression von $\beta 2$ -*integrin* und erhöht dadurch die Adhäsion myeloischer Zellen an das Endothel, was zu einer erhöhten Rekrutierung myeloischer Zellen, wie Neutrophilen, ins Zielgewebe führt (Kong et al., 2004) (siehe Abbildung 1.8).

Des Weiteren ist die Neutrophilen-Aktivität, wie Motilität, Invasion und Phagozytoseaktivität, abhängig von ATP, welches sie ausschließlich über Glykolyse generieren. Daher ist eine Regulation der Glykolyse unter inflammatorischen und damit auch hypoxischen Bedingungen essenziell. Es konnte gezeigt werden, dass HIF maßgeblich an dieser Regulation beteiligt ist (Cramer et al., 2003) (siehe Abbildung 1.8).

Neutrophile sind kurzlebige Zellen des angeborenen Immunsystems. Neben der hypoxisch-bedingten HIF-1 α -Akkumulation, führte auch die HIF-1 α -Akkumulation durch Einsatz eines Eisen-Chelators zur Verlängerung der Neutrophilen-Lebensdauer, aufgrund verminderter Apoptose-Rate (Mecklenburgh et al., 2002). Diese reduzierte Apoptose-Rate wird durch HIF-1-bedingte NF κ B-Aktivität hervorgerufen (Walmsley, Print et al., 2005) (siehe Abbildung 1.8).

Der Zell-spezifische *Knock-out* von *hif-1 α* in myeloischen Zellen führte zu metabolischen Defekten durch eine verminderte Glykolyse-Rate und einer dramatischen Reduktion des zellulären ATP-Levels, beeinträchtigte jedoch weder die Entwicklung noch die Differenzierung dieser Zellen. Mäuse mit diesem Zell-spezifischen *Knock-out* reagierten mit einer abgemilderten Immunantwort auf ein Entzündungsmodell der Haut. Die Makrophagen dieser Tiere zeigten eine beeinträchtigte Phagozytoseaktivität und Invasion in das entzündete Gewebe, aufgrund verminderter Aggregation und Motilität dieser HIF-1 α -defizienten Makrophagen im Vergleich zu Makrophagen mit funktionellem HIF-1 α (Cramer et al., 2003).

1.4 Zielsetzung

Die Zahl der Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) nimmt kontinuierlich zu. Die mit der Krankheit einhergehenden Beschwerden lassen sich durch Behandlung reduzieren, aber bisher gibt es noch keine Möglichkeit der Heilung. Die genauen Ursachen der CED sind derzeit noch unbekannt, weshalb es von großem wissenschaftlichen Interesse ist diese Krankheiten genauer zu beschreiben.

Entzündungen und Hypoxie sind eng miteinander verbunden. Viele entzündliche Krankheiten sind durch das Auftreten von Hypoxie charakterisiert. Nach dem aktuellen Stand der Wissenschaft gilt HIF-Aktivität in Epithelzellen und DC während CED als protektiv, jedoch gibt es auch Hinweise auf eine benachteiligende Wirkung von HIF während CED. Die übereilte Annahme der protektiven Wirkung von HIF und der therapeutische Einsatz von Hydroxylase-Inhibitoren könnten zu unerwünschten Nebeneffekten führen, weshalb die umfassende Untersuchung von HIF während CED notwendig ist.

Die gestörte Immunreaktion der Leukozyten wird als eine der wichtigen Ursachen für CED eingestuft. Da Makrophagen die größte Gruppe der intestinalen Leukozyten bilden und es bereits Hinweise für die Rolle von HIF in Makrophagen gibt, soll es Ziel dieser Arbeit sein, den genauen Einfluss von HIF auf die Funktion von Makrophagen während CED zu untersuchen.

Zu diesem Zweck sollen Mäuse mit einem Zell-spezifischen *Knock-out* von HIF-1 in myeloischen Zellen - Makrophagen, Neutrophilen und dendritischen Zellen - und Mäuse mit funktionellem myeloischen HIF-1 im Mausmodell der DSS-induzierten Colitis betrachtet werden. Der Krankheitsverlauf soll makroskopisch und später auch histologisch und mikrobiologisch verglichen werden. Mögliche Unterschiede sollen auf RNA- und Protein-Ebene beschrieben werden. Die Wechselwirkung der verschiedenen Immunzellen während DSS-induzierter Colitis soll dabei besondere Beachtung finden.

2 Material

2.1 Versuchstiere

Alle tierexperimentellen Versuche erfolgten mit C57BL/6J Mäusen mit einem Zell-spezifischen *Knock-out* von HIF-1 α in myeloischen Zellen (LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$) und deren Geschwister-Tieren mit funktionellem *hif-1 α* (HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$). Dieser konditionelle *Knock-out* wurde mit Hilfe des *Cre/loxP-Systems* herbeigeführt. Dabei ist das Exon 2 des *hif-1 α* Gens auf beiden Allelen von *loxP*-sites flankiert (HIF-1 $\alpha^{\text{flox/flox}}$ bzw. HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$). Das Zell-spezifische Ausschneiden des Exon 2 in myeloischen Zellen erfolgte durch das Verpaaren von homozygot-geflochten Mäusen mit Mäusen, die eine Sequenz für die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des *Lyz2* Promotors exprimieren (Clausen et al., 1999). Die daraus resultierenden Mäuse (LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$) exprimieren in myeloischen Zellen eine HIF-1 α mRNA ohne Exon 2, was zum Verlust der Funktionalität des HIF-1 α führt, da das Exon 2 für die DNA-Bindungsdomäne des Transkriptionsfaktors kodiert.

Bis zu fünf Mäuse wurden in einem Sealsafe NEXT TypII L Käfig bei 20 °C und einem 12 h-Tag-Nacht-Rhythmus im Zentralen Tierlaboratorium des Universitätsklinikums Essen unter speziell pathogenfreien Bedingungen gehalten. Pelletiertes Alleinfuttermittel und Trinkwasser wurden *ad libitum* verabreicht. Alle Tiere wiesen ein physiologisches Allgemein- und Zuchtverhalten auf. Die Tierhaltung und -zucht erfolgte im Einklang mit dem deutschen Tierschutzgesetz. Tierexperimentelle Arbeiten wurden vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV NRW) genehmigt und unter dem Aktenzeichen 84-02.04.2011.A098 geführt.

2.2 Geräte

Tabelle 2.1 Bezeichnung und Herstellerangabe der verwendeten Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Absaugpumpe	Biotec
Auflichtmikroskop CK 40	Olympus
Brutschrank Hera cell	Heraeus Instruments
CO ₂ Brutschrank	Thermo

Fluoreszenz- und Chemilumineszenzsystem	
Fusion-FX 7	Peqlab
Fluoreszenzmikroskop Eclipse E1000	Nikon
Gas Mixer Q	Ruskinn
Gefrierschrank	Liebherr
Heizblock HTM 130 / HTM 130-6	HLC
Hypoxie-Brutschrank BB6620 CUO2	Heraeus Instruments
iCycler iQ5™, Multicolor Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad
Invivo2 400 Hypoxia Workstation	Ruskinn
Kamerasystem DS Ri1	Nikon
Kühlschrank	Liebherr
Mastercycler®	Eppendorf
Microm HM 340E	Thermo Scientific
Mini Protean 3	Bio-Rad
Mini-Protean® Tetra Cell	Bio-Rad
pH-Meter	Eutech Instruments
ScanScope CS2	Aperio
Schüttler Titramax 101	Heidolph
Spektrophotometer-System Epoch/Take 3	Biotec
Sterilbank HERA Safe	Heraeus Instruments
Thermocycler Tpersonal / Tprofessional	Biometra
UV-Geldokumentationsanlage BioDoc-It	UVP
Vortexer	Bioproducts
Western Blot-Kammer Mini Trans-Blot®	Bio-Rad
Zählkammer nach Neubauer	Becton Dickinson
Zentrifugen	Eppendorf und Heraeus

2.3 Material

Tabelle 2.2 Verwendete Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
8er Kette PCR Tubes, inkl. Deckel, farbig	Starlab
Bechergläser	Schott
Deckgläser	Engelbrecht
Einmalspritzen (2 ml, 5 ml, 10 ml)	B. Braun
Erlenmeyerkolben	Schott
Gel-blotting-Papiere, GB003	Schleicher & Schuell
Hämocult-Test, hema-screen™	Immunostics. inc.
Kanülen (G27 3/4")	Becton Dickinson
Microtom Blade S35	Feather
96 Multiply® PCR Platte natur	Sarstedt
Nitrocellulose-Transfermembran, 0,2 µm Porengröße	Schleicher & Schuell
PCR-Verschluss-Klebefolie	4titude
Pinzetten	Oehme
Plastikpipetten (steril, 1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner bio-one
PP-Schraubverschluss Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner bio-one
Reaktionsgefäß (1,5 ml, 2 ml, 5 ml)	Eppendorf
Rotilabo®-Einbettkassetten	Roth
Safe-Lock Reaktionsgefäße 0,5 ml	Eppendorf
Scheren	Oehme
SuperFrost® Plus Objektträger	R. Langenbrinck
Zellkulturflaschen (T25, T75, T175)	Greiner bio-one
Zellkulturplatten (steril, 6 oder 96 Vertiefungen)	Greiner bio-one

2.4 Chemikalien, Reagenzien, Puffer und Lösungen

Tabelle 2.3 Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich
5-fach GoTaq® Buffer	Invitrogen
100 bp DNA Ladder	Invitrogen
ABC-Kit	Vectastain
Advanced Minimum Essential Medium (aMEM)	Gibco
Aceton	Sigma-Aldrich
Acrylamid/Bisacrylamid (30 %)	Bio-Rad
Agarose	Invitrogen
Alcian Blau Lösung	Sigma-Aldrich
Ammoniumchlorid	Sigma-Aldrich
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad
Antibody Diluent	DAKO
Avidinblock	DAKO
Biotinblock	DAKO
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
Bovines Serum Albumin (BSA)	SERVA
CSA-I-Kit	DAKO
Cytoseal XYL	Thermo Scientific
3,3'-Diaminobenzidin (DAB) Peroxidase (HRP) Substrate Kit	Vectastain
Dextrannatriumsulfat (DSS)	MP Biomedicals
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich
Direct Red 80	Sigma-Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco
ECL Advance™ Western Blotting Detection Kit	GE Healthcare
Eosin Y Lösung	Sigma-Aldrich
Essigsäure	Fluka
Ethanol	Roth
Ethylenbis(oxyethylenitrilo)-tetraessigsäure (EGTA)	Fluka
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich
Fetales Kälberserum (FCS, engl. <i>fetal calf serum</i>)	Biochrom AG

Fluorescence Mounting Medium	Dako
Glutamin	Invitrogen
Glycerin	Merck
Glycin	Fluka
GoTaq® DNA Polymerase	Promega
Guanidiniumthiocyanat (GTC)	Roth
Isopropanol	Sigma-Aldrich
Kaliumchlorid (KCl)	AppliChem
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma-Aldrich
Mayers Hämalaunlösung	Merck
β-Mercaptoethanol	Merck
MESA Green qPCR MastermixPlus for SYBR® ASSAY	Eurogentec
Methanol	Sigma-Aldrich
M-MLV Reverse Transcriptase	Promega
M-MLV RT 5-fach Reaction Buffer	Promega
Natriumacetat	Sigma-Aldrich
Natriumazid	AppliChem
Natriumchlorid (NaCl)	Fluka
Natriumdodecylsulfat (SDS, engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)	Roth
Natriumfluorid (NaF)	Fluka
Natriumhydrogencarbonat	Fluka
Natriumdihydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Fluka
Natriumpyruvat	Gibco
Normales Ziegenserum (NGS, engl. <i>normal goat serum</i>)	Sigma-Aldrich
Nonidet® P40 (NP40)	AppliChem
Nukleosidtriphosphate (NTP)	Promega
Oligo Desoxythymidin (dT)	Invitrogen
Paraffin	McCormick
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich
Penicillin	Gibco
Peroxidaseblock (CSA-I-Kit)	DAKO
Phenol	AppliChem
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol	AppliChem
Pikrinsäure	Sigma-Aldrich
Ponceau S	Sigma-Aldrich
Protease-Inhibitor	Roche Diagnostics

Protein Assay Reagent A (Reagenz A)	Bio-Rad
Protein Assay Reagent B (Reagenz B)	Bio-Rad
Proteinblock (CSA-I-Kit)	DAKO
Retrieval-Lösung	DAKO
RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit	Qiagen
RPMI-Medium 1640	Gibco
Salzsäure (HCl)	Fluka
Streptomycin	Gibco
Target Retrieval Solution	Dako
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	AppliChem
Trypanblau	Merck
Trypsin-EDTA	Gibco
Tween 20	Roth
Vector® Mouse on Mouse (M.O.M.™) Kit	Vector Labs
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck
Xylol	Roth

Tabelle 2.4 Verwendete Puffer und Lösungen

Name	Zusammensetzung
4-fach SDS-Probenpuffer	200 mM Tris pH 6,8 8 % SDS 10 % β -Mercaptoethanol 0,02 % Bromphenolblau 40 % Glycin
10-fach Laufpuffer (Western Blot)	25 mM Tris 192 mM Glycin 3,5 mM SDS
10-fach PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na_2HPO_4 2 mM KH_2PO_4 pH 7,2
10-fach TBS (Western Blot)	137 mM NaCl 20 mM Tris pH 7,6
Blotpuffer (Western Blot)	25 mM Tris 96 mM Glycin 20 % Methanol
BMDM-Medium	aMEM 10 % FCS 1 % Hepes 4 mM Glutamin 1 mM Natriumpyruvat 0,06 mM β -Mercaptoethanol 100 U/ml Penicillin 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin

Colon-Lysepuffer	150 mM NaCl 5 mM KCl 10 mM Hepes 0,5 mM EDTA 0,2 mM EGTA 1 mM NaF 1 mM DTT 0,05 % NP40 10 % Protease-Inhibitor (vor Gebrauch)
DEPC-H ₂ O	H ₂ O 0,1 % DEPC 1 h bei RT rühren steril autoklavieren
L929-Medium	DMEM 10 % FCS
Lower Buffer (Western Blot)	1,5 M Tris 13,9 mM SDS pH 8,8
Lysepuffer	0,5 % NP40 150 mM NaCl 10 mM Tris pH 7,9 2 mM EDTA 10 % Protease-Inhibitor (vor Gebrauch)
MEM/Hepes-Medium	aMEM 1 % Hepes
PBS-T (Histologie)	1-fach PBS 0,05 % Tween 20

Siriusrot-Färbelösung	Pikrinsäure 0,1 % Direct Red 80 mindestens 24 h ruhen lassen Überstand verwenden
TAE (PCR)	40 mM Tris 0,11 % Essigsäure 1 mM EDTA pH 8,0
TBS-T (Histologie)	1-fach TBS 0,05 % Tween 20
TBS-T (Western Blot)	1-fach TBS 0,1 % Tween 20
Upper Buffer (Western Blot)	251 mM Tris 6,9 mM SDS pH 6,8

2.5 Antikörper

Tabelle 2.5 Antikörper für Western Blot

Name	Typisierung	Hersteller
anti-Aktin (N-Term)	Kaninchen, polyklonal	Sigma-Aldrich
HIF-1 α (C-Term)	Kaninchen, polyklonal	Cayman Chemical

Tabelle 2.6 Antikörper für Immunhistochemie

Name	Typisierung	Hersteller
anti-Kaninchen Alexa 568	Ziege IgG	Invitrogen
anti-Ratte 568	Ziege IgG	Invitrogen
anti-Ratte, biotinyliert	Ziege IgG	Santa Cruz
F4/80	Ratte	AbD Serotec
FOXP3	Ratte	eBioscience
MUCIN-2	Kaninchen	Santa Cruz

2.6 Oligonukleotide

Alle folgend aufgelisteten Primer wurde von der Firma Invitrogen bezogen.

Tabelle 2.7 Primersequenz, Produktlänge und Annealing-Temperatur

Zielgen	Sequenz	Produkt- länge (bp)	qPCR Bedingungen
5' <i>aldh1a1</i> 3' <i>aldh1a1</i>	TGTCGGATTTAGGAGGCTGC AAGGGCAGGGCCTATCTTCC	194	60 °C, 40 Zyklen
5' <i>aldh1a2</i> 3' <i>aldh1a2</i>	ATCGCTTCTCACATCGGCAT CAGCGTAGTCCAAGTCAGCA	166	60 °C, 40 Zyklen
5' <i>arg-1</i> 3' <i>arg-1</i>	AACACGGCAGTGGCTTTAACC GGTTTTTCATGTGGCGCATTC	117	60 °C, 40 Zyklen
5' <i>cd4</i> 3' <i>cd4</i>	TGAAGGAAACGCTCCCCTC AGCAGTGCTGATGTCTTGCT	136	60 °C, 40 Zyklen
5' <i>cd8a</i> 3' <i>cd8a</i>	ACCCTTGCCCGGAATCTGCG CTGTCTGACTAGCGGCCTGGGA	112	60 °C, 40 Zyklen
5' <i>cd11c</i> 3' <i>cd11c</i>	GGACGGTGCTGAGTTCGGACACAG CCACAAGCCAACAGCCAGGAAGG	231	60 °C, 40 Zyklen
5' <i>cd177</i> 3' <i>cd177</i>	TACGTCTATGAGCAGCAGCG GCAGTCCTCCGTCAGAAACA	161	60 °C, 40 Zyklen
5' <i>f4/80</i> 3' <i>f4/80</i>	TCTGGGGAGCTTACGATGGA GAATCCCGCAATGATGGCAC	237	60 °C, 40 Zyklen
5' <i>foxp3</i> 3' <i>foxp3</i>	CTGGCGAAGGGCTCGGTAGTCCT CTCCCAGAGCCCATGGCAGAAGT	250	60 °C, 40 Zyklen 1/2 der Primermenge
5' <i>glut-1</i> 3' <i>glut-1</i>	GAGGAGCTCTTCCACCCTCT TCCTCCTGGACTTCACTGC	172	60 °C, 40 Zyklen
5' <i>hif-1α</i> exon 2	CATCCAGAAGTTTTCTCACACG	138	60 °C, 40 Zyklen

3' <i>hif-1α</i> <i>exon 2</i>	GGCGAAGCAAAGAGTCTGAA		
5' <i>ifnγ</i> 3' <i>ifnγ</i>	GGTCAACAACCCACAGGTCC CAGCGACTCCTTTTCCGCTT	105	60 °C, 45 Zyklen
5' <i>il-6</i> 3' <i>il-6</i>	TCCTACCCCAATTTCCAATGC CATAACGCACTAGGTTTGCCG	151	60 °C, 40 Zyklen
5' <i>il-10</i> 3' <i>il-10</i>	TGCCCCAGGCAGAGAAGCAT GGGAGAAATCGATGACAGCGCC	109	60 °C, 40 Zyklen 2/3 der Primermenge
5' <i>il-17a</i> 3' <i>il-17a</i>	TCATCCCTCAAAGCTCAGCG TTCATTGCGGTGGAGAGTCC	167	62 °C, 45 Zyklen 1/2 der Primermenge
5' <i>inos</i> 3' <i>inos</i>	ACATCGACCCGTCCACAG CAGAGGGGTAGGCTTGTCTC	198	65 °C, 40 Zyklen
5' <i>lcn-2</i> 3' <i>lcn-2</i>	ACGGACTACAACCAGTTCGC CATTGGTTCGGTGGGGACAGA	188	60 °C, 40 Zyklen
5' <i>ly6g</i> 3' <i>ly6g</i>	GTACCTTGGGAAGATGTGGGT GTTCAGGCCAGCTTATGGT	103	62 °C, 40 Zyklen
5' <i>muc2</i> 3' <i>muc2</i>	GCTGACGAGTGGTTGGTGAATG GATGAGGTGGCAGACAGGAGAC	135	60 °C, 40 Zyklen
5' <i>muc3</i> 3' <i>muc3</i>	AGTGCTGTTGGTGATCCTCG AGAGTCCAGGGGCATGTAGT	193	57 °C, 40 Zyklen
5' <i>rP</i> 3' <i>rP</i>	AGATGATCGAGCCGCGC GCTACCAGGGCCTTTGAGATGGA	163	60 °C, 35 Zyklen
5' <i>tgfβ1</i> 3' <i>tgfβ1</i>	TGGCCAGATCCTGTCCAAAC CATAGATGGCGTTGTTGCGG	215	60 °C, 40 Zyklen
5' <i>tnfa</i> 3' <i>tnfa</i>	CGGGGTGATCGGTCCCCAAAG GGAGGGCGTTGGCGCGCTGG	140	60 °C, 40 Zyklen

3 Methoden

3.1 Tierversuche

3.1.1 DSS-Versuch

Mindestens 10 Wochen alte HIF-1 $\alpha^{+/+}$ - oder LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere wurden mit 2,5 % Dextrannatriumsulfat (DSS, engl. *dextran sodium sulfate*) mit einem Molekulargewicht von 36-50 kDa für 4-6 Tage behandelt um eine Colitis zu induzieren (Perše & Cerar, 2012; Shah et al., 2008). DSS wurde in Leitungswasser gelöst und nach drei Tagen erneuert. Es erfolgte die tägliche Aufzeichnung von Körpergewicht, Stuhlbeschaffenheit und Blut im Stuhl mit Hilfe eines Hämo occult-Tests jedes Tieres. Diese Werte konnten verwendet werden um einen Disease Activity Index (DAI) (Cooper et al., 1993) zur Bestimmung der Schwere der Erkrankung zu erstellen.

Tabelle 3.1 DAI Punkteaufteilung

Score	Gewichtsverlust	Stuhlbeschaffenheit	Blut im Stuhl
0	0 %	geformt	Hämo occult-Test negativ
1	1-5 %		
2	6-10 %	breiig	Hämo occult-Test positiv
3	11-20 %		
4	> 20 %	flüssig	sichtbares Blut

3.1.2 Gewebeentnahme

Die Versuchstiere wurden durch zervikale Dislokation getötet und das Abdomen mit einer Schere eröffnet. Das Colon wurde an Caecum und Anus abgetrennt und entnommen. Nach Entleerung des Colons durch PBS-Spülung wurden das Gewicht und die Länge bestimmt und protokolliert. Zwecks RNA-Gewinnung wurden 0,5 cm distales Colon und 1-2 mesenteriale Lymphknoten in je einem 2 ml Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert. Für histologische Untersuchungen wurde ein 1 cm langes Stück distalen Colons, 1-2 mesenteriale Lymphknoten und 1/3 der Milz in 4 % PFA überführt und üN inkubiert. Außerdem wurde 1 cm distales Colon für die Proteinisolation entnommen, in einem 2 ml Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff schockgefroren, in 300 µl Colon-Lysepuffer bis zum Erreichen einer klaren

Flüssigkeit homogenisiert und anschließend bei -80 °C gelagert. 5 µl Proteinlysate wurden zur Proteinbestimmung nach Lowry (siehe 3.4.1) verwendet.

3.2 Zellkultur

Zur Kultivierung von Makrophagen aus dem Knochenmark (BMDM, engl. *bone marrow derived macrophages*) wurde M-CSF (engl. *macrophage colony-stimulating factor*) von L929-Zellen gewonnen. Diese wurden in T175 Zellkulturflaschen mit 30 ml L929-Medium semi-konfluent kultiviert. Nach einer Woche Kultivierung geben die L929-Zellen M-CSF ins Medium ab. Dieses Medium wurde vollständig abgenommen, steril filtriert und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt (im Folgenden als L929-Überstand bezeichnet).

Knochenmark von HIF-1 $\alpha^{fl+/fl+}$ und LysMCre/HIF-1 $\alpha^{fl+/fl+}$ Mäusen wurde durch Spülen von Femur und Tibia mit MEM/Hepes-Medium und einer G27 $\frac{3}{4}$ “ Kanüle gewonnen, für 5 min bei 1200 g zentrifugiert, das Pellet in 7 ml BMDM-Medium gelöst und in bei 37 °C und 5 % CO₂ in einer T25 Zellkulturflasche kultiviert. Nicht-adhärenente Zellen wurden 5 min bei 1200 g zentrifugiert, das Zellpellet in BMDM-Medium gelöst, die Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Kammer bestimmt und 1×10^6 Zellen pro ml in BMDM-Medium mit 25 % L929-Überstand in Zellkulturplatten mit 6 Vertiefungen zu Makrophagen differenziert. Alle zwei Tage wurde 50 % Medium abgenommen und mit frischem BMDM-Medium mit 20 % bzw. 10 % L929-Überstand ersetzt. Am Tag 7 wurde das Medium vollständig durch frisches BMDM-Medium ersetzt und der gewünschte Versuch durchgeführt (Ueda et al., 2010).

Zur Isolierung von RNA aus BMDM wurde das Medium vollständig abgenommen und pro Vertiefung 700 µl GTC hinzugefügt, welches durch das Zerstören von Wasserstoffbrückenbindungen denaturierende Wirkung hat. Nach 5 min Inkubation auf dem Schüttler konnten die Zellkulturplatten bis zur weiteren RNA-Isolation bei -20 °C gelagert werden.

Zur Isolierung von Proteinen aus BMDM wurden die Zellkulturplatten auf Eis gestellt, das Medium vollständig abgenommen und pro Vertiefung 65 µl Lysepuffer hinzugefügt. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen vom Boden der Zellkulturplatten gelöst, das Proteinlysate einer jeden Vertiefung wurde in je ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und 20 min auf Eis inkubiert. Nach 5 min Zentrifugation bei 5000 rpm und 4 °C wurde der Überstand in ein neues

Reaktionsgefäß überführt. Zur Proteinbestimmung nach Lowry (siehe 3.4.1) wurden 5 µl des Proteinlysats verwendet.

3.3 RNA, cDNA und PCR

3.3.1 RNA-Isolierung aus Gewebe

Die bei -80 °C in 2 ml Reaktionsgefäßen gelagerten Gewebeproben wurden in Flüssigstickstoff zwischengelagert, um ein Auftauen zu vermeiden. Je Reaktionsgefäß wurden 600 µl RLT-Puffer (RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit, Qiagen) hinzugefügt und das Gewebe anschließend max. 30 s bis zum Erreichen einer klaren Lösung homogenisiert. Anschließend wurde das RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit der Firma Qiagen verwendet und das Hersteller-Protokoll zur Isolierung totaler RNA aus Tiergewebe befolgt. Die RNA-Konzentration wurde am Epoch Spektrophotometer in einer 1:10 Verdünnung mit VE-Wasser ermittelt.

3.3.2 RNA Isolierung aus Zellkultur

Die Zellkulturplatten wurden auf dem Schüttler bis zum Auftauen der Zelllysate inkubiert. Anschließend wurden die Zelllysate einer jeden Vertiefung in je ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und mit je 70 µl 2 M Natriumacetat angesäuert. Unter dem Abzug wurden 500 µl Phenol und 350 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol hinzugegeben und gut durchmischt, bis eine weißlich trübe Suspension entstand. Bei Bedarf konnten weitere 100 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol hinzugefügt werden. Die Suspensionen wurden anschließend 30-60 min auf Eis inkubiert. Hierbei denaturierte das Phenol-Chloroform-Gemisch Proteine und der Isoamylalkohol verhinderte eine Schaumbildung der Suspension. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 13.200 rpm und 4 °C für 30-40 min um eine Auftrennung von organischer Phase (unten), Interphase (enthält DNA) und wässriger Phase (oben, enthält RNA) zu erzielen. Die wässrige Phase wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße mit 600 µl Isopropanol überführt und üN bei -20 °C gelagert. Dies führte zur Fällung der RNA, da die Löslichkeit von RNA in organischen Lösungsmitteln sehr gering ist.

Am Folgetag wurden die Proben direkt in eine gekühlte Zentrifuge transferiert und bei 13.200 rpm und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bis zu 1 h unter dem Abzug getrocknet, wobei Phenolreste aus dem Reaktionsgefäß entfernt wurden. Anschließend wurde das Pellet in 300 µl

GTC und 500 µl Isopropanol durch vortexen gelöst und üN bei -20 °C gelagert, was zur Umfällung der RNA führte und die Reinheit der RNA erhöhte.

Folgend wurden die Proben erneut direkt in eine gekühlte Zentrifuge transferiert und bei 13.200 rpm und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bis zu 30 min getrocknet. Anschließend erfolgte ein Waschschrift mit 500 µl 75 % EtOH (mit 25 % DEPC-Wasser). Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 13.200 rpm und 4 °C für 30 min wurde der Überstand verworfen und das Pellet für mindestens 30 min getrocknet, sodass mögliche Ethanol-Kontaminationen beseitigt wurden. Abschließend wurde das Pellet in 10 µl DEPC-Wasser bei 60 °C für maximal 10 min gelöst und konnte bis zum weiteren Gebrauch bei -20 °C gelagert werden. Die RNA-Konzentration wurde am Epoch Spektrophotometer in einer 1:10 Verdünnung mit VE-Wasser ermittelt.

3.3.3 cDNA-Synthese

Zur cDNA-Synthese wurde 1 µg totale RNA eingesetzt und mit DEPC-Wasser auf ein Reaktionsvolumen von 9,5 µl gebracht. Durch Zugabe von 2,5 µl Oligo dT und Inkubation bei 68 °C für 10 min und anschließende 3 min auf Eis wurde die RNA denaturiert und eine Anlagerung der Oligo dT herbeigeführt, welche bei der cDNA-Synthese als Primer fungieren, indem sie an den Poly-A-Schwanz der RNA binden. Anschließend wurden pro Ansatz 2,5 µl DEPC-Wasser, 5 µl 5-fach M-MLV Puffer, 5 µl dNTPs und 0,5 µl M-MLV reverse Transkriptase hinzugefügt. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne RNA. Die cDNA-Synthese erfolgte im Mastercycler® in folgenden Schritten:

45 °C	90 min
52 °C	30 min
95 °C	15 min

Die cDNA konnte bis zum weiteren Gebrauch bei 4 °C gelagert werden.

3.3.4 Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) können Gene exponentiell aus cDNA vervielfältigt und somit trotz geringer Ausgangsmenge nachgewiesen werden. Der PCR-Reaktionsansatz wurde wie folgt angesetzt:

5 µl	5-fach Puffer
2 µl	dNTP
0,5 µl	je Primer
17 µl	dH ₂ O
0,05 µl	GoTaq

Als *Template* wurden 0,5 µl cDNA eingesetzt. Außerdem wurden auch die Negativkontrolle der cDNA-Synthese und eine Negativkontrolle für die PCR, welche keine cDNA enthielt, angesetzt. Das Standard-PCR-Programm war folgendermaßen eingestellt:

96 °C	3 min	Initialphase
96 °C	1 min	Denaturierung
x °C	1 min	<i>Annealing</i>
72 °C	3 min	Elongation
72 °C	10 min	abschließende Synthese

Die *Annealing*-Temperatur und die Wiederholung (Zyklen) der Schritte Denaturierung, *Annealing* und Elongation waren abhängig von den verwendeten Primern und können der Tabelle 2.7 entnommen werden. Die Anzahl der Zyklen lag bei der qualitativen PCR in der Regel 10 Zyklen unter der Anzahl für die qPCR, die in dieser Tabelle dargestellt ist.

Zum Nachweis des PCR-Produkts wurden je 20 µl des PCR-Reaktionsansatzes auf ein 2 %iges Agarosegel aufgetragen, welches 0,08 % Ethidiumbromid als Detektionsmittel enthielt. Die Visualisierung des PCR-Produkts erfolgte nach 30 min Gelelektrophorese bei 80 V mittels UV-Licht.

3.3.5 Quantitative PCR (qPCR)

Zur quantitativen Auswertung der Genexpression wurde die Methode der Echtzeit-PCR gewählt. Der qPCR-Reaktionsansatz wurde wie folgt zusammengestellt:

12 µl	MESA Green qPCR MastermixPlus
11 µl	dH ₂ O
0,5 µl	je Primer

Als *Template* wurde 1 µl cDNA eingesetzt. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne cDNA. Der entstandene 25 µl Reaktionsansatz wurde als Doppelbestimmung (2 x 10 µl) in eine Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen pipettiert und die qPCR im iCycler iQ5TM mit folgendem Standardprogramm durchgeführt.

95 °C	10 min	Initialphase
95 °C	15 s	Denaturierung
x °C	90 s	Annealing/Elongation

Die *Annealing*-Temperatur und die Wiederholungen (Zyklen) der Schritte Denaturierung und *Annealing*/Elongation können der Tabelle 2.7 entnommen werden.

Die Auswertung erfolgte mittels der $\Delta\Delta C_T$ Methode (engl. *Cycle Threshold*), wobei die ermittelten C_T -Werte der einzelnen Proben auf die C_T -Werte des homogen exprimierten Gens ribosomales Protein normalisiert wurden. Somit konnten die Unterschiede der Genexpression als n-fache Änderung berechnet werden (Winer et al., 1999).

3.4 Proteine und Western Blot

3.4.1 Proteinbestimmung nach Lowry

Zur Proteinbestimmung nach Lowry (Lowry et al., 1951) wurden in Doppelbestimmung je 5 µl eines Bovines Serum Albumin (BSA)-Standards (25 - 0,1 mg/ml BSA) und 5 µl Proteinlysate der Probe in eine Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen vorgelegt und 10 µl Reagenz A und 80 µl Reagenz B hinzugefügt. Nach 10 min Inkubation bei RT wurde die Extinktion bei 700 nm im Epoch Spektrophotometer gemessen und die Proteinkonzentration anhand der Standardreihe berechnet.

3.4.2 SDS-Page

Die Auftrennung der Proteine unter denaturierenden Bedingungen erfolgte mit Hilfe der Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) nach Laemmli (Laemmli, 1970). 5 %ige Sammel- und 7,5 %ige Trenngele waren wie folgt zusammengesetzt:

	Sammelgel (5 %)	Trenngel (7,5 %)
A. dest	2,92 ml	5 ml
Bisacrylamid 30 %	0,83 ml	2,5 ml
4-fach Upper Buffer	1,25 ml	--
4-fach Lower Buffer	--	2,5 ml

40 µg Proteinlysate wurde 1:4 mit 4-fach SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95 °C denaturiert, auf das Sammelgel aufgetragen und 90-120 min bei 120 V aufgetrennt.

3.4.3 Western Blot

Der Proteintransfer von Polyacrylamid-Gelen auf Nitrocellulosemembranen erfolgte nach der Methode von Towbin (Towbin et al., 1979) elektrophoretisch bei 120 V für 90 min. Der erfolgreiche Transfer von Proteinen aus dem Gel auf die Membran wurde durch Visualisierung mit Hilfe von Ponceau S Lösung bestätigt. Nach Entfernung der Ponceau S Lösung und Waschen in TBS-T wurde durch Inkubation in TBS-T mit 5 % Magermilch für 1 h bei RT die unspezifische Bindung von Antikörpern an die Membran reduziert. Die Inkubation des gewünschten Antikörpers erfolgte bei 4 °C üN (anti-Aktin 1:1000, HIF-1α 1:500 in 5 % Magermilch). Nach anschließendem Waschen in TBS-T (3 x 5 min) erfolgte die Sekundärantikörper-Behandlung (anti-Kaninchen 1:100000 in 5 % Magermilch) für 1 h bei RT. Nach erneutem Waschen in TBS-T (3 x 5 min) konnte das Chemilumineszenz-Signal der an den Zweitantikörper gekoppelten Meerrettichperoxidase mit Hilfe des ECL-Detektionssystem am Fusion-FX7 aufgenommen werden.

3.5 Histologische Methoden

3.5.1 Gewebepvorbereitung

Nach Entnahme des Gewebes wurde dieses ün bei 4 °C in 4 % PFA inkubiert und nachfolgend in Einbettkassetten verschlossen.

Das in den Einbettkassetten befindliche Gewebe wurde für 15 min in PBS bei RT inkubiert und anschließend in 70 % EtOH überführt, worin es bis zur Aufbereitung bei RT gelagert werden konnte. Das Entwässern in einer aufsteigenden Alkoholreihe, Ersetzen des Alkohols durch ein Intermedium und Paraffinieren der Proben erfolgte im Institut für Anatomie des Universitätsklinikums Essen.

Nach der Aufbereitung des Gewebes konnte dieses in Paraffin eingebettet werden. Lymphknoten und Milz wurden im Ganzen eingebettet, der distale Colon-Abschnitt wurde, wenn möglich, halbiert und aufrecht eingebettet, sodass anschließend Querschnitte erstellt werden konnten. Nach Aushärten der Paraffinblöcke konnten diese bis zum Schneiden bei RT gelagert werden.

Um Gewebeschnitte anzufertigen wurden die Paraffinblöcke vor dem Schneiden bis zu 24 h bei -20 °C gekühlt und anschließend am Rotationsmikrotom in 1-5 µm dicke Gewebeschnitte geschnitten, welche in einem 37 °C warmen Wasserbad geglättet und anschließend auf SuperFrost® Plus Objektträger aufgezogen wurden. Die getrockneten Gewebeschnitte konnten bis zur Färbung bei RT gelagert werden.

3.5.2 Hämatoxylin/Eosin-Färbung

Zur histologischen Untersuchung des Colon- und Lymphknoten-Gewebes wurden die Gewebeschnitte mit Hämatoxylin und Eosin (H&E) gefärbt. Dabei färbt Hämatoxylin alle sauren und basophilen Strukturen blau und Eosin alle basischen oder acidophilen Strukturen rot.

Zu Beginn wurden die Gewebeschnitte durch zweimalige Inkubation in Xylol für jeweils 10 min entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe (je 5 min, Isopropanol, 90 % EtOH, 70 % EtOH, 50 % EtOH) rehydriert. Nach kurzer Inkubation der Gewebeschnitte in VE-Wasser erfolgte die Hämatoxylin-Färbung für 1 min. Anschließend wurden die Gewebeschnitte unter laufendem Leitungswasser bis zu 5 min inkubiert, sodass ein pH-Wert-Wechsel erfolgte und das Wasser klar wurde. Nach erneuter kurzer Inkubation der Gewebeschnitte in VE-Wasser erfolgte die Eosin-Färbung für 1 min. Die Färbung wurde durch kurze

Inkubationen in VE-Wasser, 50 % EtOH und 70 % EtOH gestoppt. Anschließend erfolgte eine Dehydrierung der Gewebeschnitte mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 5 min, 90 % EtOH, Isopropanol, Xylol, Xylol). Abschließend konnten die Gewebeschnitte mit Cytoseal XYL eingedeckt werden.

3.5.2.1 Beurteilung der Colon Schädigung

Die H&E-gefärbten Colon-Gewebeschnitte wurden verblindet und mikroskopisch am ScanScope CS2 aufgenommen. Anschließend erfolgte eine Beurteilung der Gewebeschädigung. Der histologische Score wurden nach folgendem Punktesystem ermittelt (Cooper et al., 1993):

Tabelle 3.2 Histologischer Score

Score	infiltrierte Immunzellen	Ausmaß	Kryptenschaden
0	keine	nicht vorhanden	kein Schaden
1	gering	mucosal	basal 1/3
2	mittel	mucosal und submucosal	basal 2/3
3	viel	transmural	nur Epitheloberfläche intakt
4			Krypten und Epithel betroffen

3.5.3 Hypoxyprobe-Färbung

Zur Visualisierung von Hypoxie in Colon-Gewebeschnitten wurde das 2-Nitroimidazol Pimonidazol verwendet. Dieses wird unter hypoxischen Bedingungen reduziert, bindet anschließend an Thiolgruppen von Molekülen wie z.B. Aminosäuren und Proteinen und akkumuliert daraufhin im Gewebe (Arteel et al., 1998). Zu diesem Zweck wurde den Versuchstieren 1 h vor Versuchsende 60 mg/kg Pimonidazol in 100 µl NaCl intraperitoneal injiziert, sodass dieses in hypoxischem Gewebe akkumulieren konnte (Hindryckx et al., 2010).

Die Gewebeschnitte wurden durch dreimalige Inkubation in Xylol für jeweils 5 min entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe (je 3 min, 100 % EtOH, 100 % EtOH, 96 % EtOH, 90 % EtOH, 80 % EtOH, 70 % EtOH) rehydriert. Nach kurzer Inkubation in VE-Wasser erfolgte eine Antigendemaskierung, indem die Gewebeschnitte für 15 min in einer Küvette mit 10 % *Retrieval* Lösung gekocht

wurden. Nach Abkühlen der Gewebeschnitte und zweimaligem Waschen in PBS erfolgte ein Peroxidaseblock für 10 min in 3 % H₂O₂ um unspezifische Färbung durch Pseudoperoxidasen und endogene Peroxidasen zu verhindern. Nach zweimaligem Waschen in PBS erfolgte zusätzlich ein Proteinblock mit MOM Mouse Ig *Blocking Reagent* üN bei RT um eine unspezifische Bindung des Erstantikörpers an das Gewebe zu verhindern. Anschließend konnte der Primärantikörper HP-1 (1:50 in MOM-*Diluent*) für 2 h 15 min bei RT auf die Gewebeschnitte aufgetragen werden. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde der Sekundärantikörper MOM-biotinylierter anti-*mouse* IgG für 10 min bei RT auf den Gewebeschnitten inkubiert. Die Peroxidase-Reaktion erfolgte mit dem ABC- und DAB-Kit nach Herstellerangaben. Eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin, Entwässerung und Eindecken der Gewebeschnitte wurde wie in 3.5.2 beschrieben durchgeführt.

3.5.4 HIF-1 α -Färbung

Zur Visualisierung von HIF-1 α in Colon-Gewebeschnitten wurde ein Antikörper verwendet, welcher eine Domäne des HIF-1 α -Proteins bindet, die durch Cre-Aktivität in LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -Tieren nicht verändert wird. Somit wurden sowohl funktionelles HIF-1 α der HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -Tiere, das eine DNA-Bindungsdomäne enthält, als auch das verkürzte, funktionslose HIF-1 α -Protein der LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -Tiere markiert.

Das Entparaffinieren und die Antigendemaskierung erfolgten wie in 3.5.3 beschrieben. Anschließend erfolgten nach zweimaligem Waschen in TBS-T ein Avidinblock für 20 min, ein Biotinblock für 20 min, ein Peroxidaseblock für 10 min und ein Proteinblock für 1h jeweils abwechselnd mit zweimaligem Waschen in TBS-T. Die Blockierungsreagenzien wurden von der Firma DAKO verwendet. Der Primärantikörper gegen HIF-1 α wurde 1:10000 in *Antibody Diluent* verdünnt und üN bei 4 °C auf den Gewebeschnitten inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit TBS-T wurde der biotinylierte Sekundärantikörper der Firma DAKO 1:500 in *Antibody Diluent* verdünnt und für 15 min bei RT auf die Gewebeschnitte aufgetragen. Alle folgenden Schritte für die Peroxidase-Reaktion erfolgten nach Herstellerangaben mit dem DAKO CSA-I-Kit. Eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin, Entwässerung und Eindecken der Gewebeschnitte wurde wie in 3.5.2 beschrieben durchgeführt.

3.5.5 F4/80-Färbung

Für die Lokalisation von Makrophagen im Colon-Gewebe wurde eine F4/80-Färbung durchgeführt. Die Gewebeschnitte wurden wie in 3.5.3 beschrieben entparaffiniert, rehydriert und einer Antigendemaskierung unterzogen. Nach Abkühlen der Gewebeschnitte und zweimaligem Waschen in PBS-T wurde das Gewebe auf dem Objektträger mit 5 % NGS in TBS für 1 h inkubiert um spätere unspezifische Bindung des Erstantikörpers zu verhindern. Nach Absaugen der NGS-haltigen Lösung wurde der Erstantikörper (1:100 in NGS-Lösung) auf den Gewebeschnitt aufgebracht und für 1 h bei RT oder üN bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde erneut zweimalig in PBS-T gewaschen, der biotinylierte Zweitantikörper (1:200 in NGS-Lösung) aufgebracht und für 1 h bei RT inkubiert. Die Peroxidase-Reaktion erfolgte mit dem ABC- und DAB-Kit nach Herstellerangaben. Eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin, Entwässerung und Eindecken der Gewebeschnitte wurde wie in 3.5.2 beschrieben durchgeführt.

3.5.6 Alcianblau-Färbung

Zum histologischen Nachweis von Mucus in Colon-Gewebeschnitten wurde eine Alcianblau-Färbung durchgeführt. Bei dieser Färbung werden Muco-polysaccharide und essigsäure Mucine blau eingefärbt.

Das Entparaffinieren und Rehydrieren der Gewebeschnitte erfolgte wie bei der H&E-Färbung (siehe 3.5.2). Nach kurzer Inkubation der Gewebeschnitte in VE-Wasser folgte die Alcianblau-Färbung für 10 min. Anschließend wurde unter laufendem Leitungswasser und folgend in VE-Wasser gewaschen. Die Gegenfärbung mit Eosin für 2 min wurde durch kurze Inkubation in VE-Wasser, 50 % EtOH und 70 % EtOH gestoppt. Die Dehydrierung und das Eindecken der Gewebeschnitte wurde wie in 3.5.2 beschrieben durchgeführt.

3.5.7 Siriusrot-Färbung

Zur Visualisierung von Colon-Gewebeschädigung wurde eine Siriusrot-Färbung mit Colon-Gewebeschnitten durchgeführt. Hierbei werden Kollagenfasern angefärbt, welche auf Fibroseareale hindeuten.

Das Entparaffinieren und Rehydrieren der Gewebeschnitte erfolgte wie bei der H&E-Färbung (siehe 3.5.2). Nach kurzer Inkubation der Gewebeschnitte in VE-Wasser folgte die Hämatoxylin-Färbung für 10 min. Anschließend wurde unter

laufendem Leitungswasser für 10 min und folgend kurz in VE-Wasser gewaschen. Die Färbung mit Siriusrot erfolgte für 30 min. Nach drei kurzen Waschschritten in 100 % EtOH und 1 min in Xylol wurden die Gewebeschnitte mit Cytoseal XYL eingedeckt.

3.5.8 Fluoreszenz-Färbung

Die Gewebeschnitte wurden wie in 3.5.3 beschrieben entparaffiniert, rehydriert und einer Antigendemaskierung unterzogen. Nach Abkühlen der Gewebeschnitte und zweimaligem Waschen in TBS wurde das Gewebe auf dem Objektträger mit 5 % NGS in TBS für 1 h inkubiert um spätere unspezifische Bindung des Erstantikörpers zu verhindern. Nach Absaugen der NGS-haltigen Lösung wurde der Erstantikörper in geeigneter Verdünnung (siehe Tabelle 3.3) auf den Gewebeschnitt aufgebracht und für 1 h bei RT oder üN bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde erneut zweimalig in TBS gewaschen, der Zweitantikörper in geeigneter Verdünnung (siehe Tabelle 3.3) aufgebracht und für 1 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in TBS erfolgte eine Gegenfärbung mit DAPI (1:10000 in VE-Wasser) für 5 min bei RT. Nach erneutem Waschen (2 x in TBS, 1 x in VE-Wasser) konnten die Gewebeschnitte in *Fluorescence Mounting Medium* eingedeckt werden.

Tabelle 3.3 Verwendete Verdünnungen von Erst- und Zweitantikörpern für Fluoreszenz-Färbungen

Name	Verdünnung
anti-Kaninchen Alexa 568	1:500
anti-Ratte 568	1:200
FOXP3	1:100
MUCIN-2	1:50

3.6 Mikroskop

Gefärbte Gewebeschnitte wurden am Nikon Eclipse E1000 Mikroskop mit einem DS-Ri1 Kamerasystem unter der Verwendung der NIS-Elements F.3.0 Imaging Software aufgenommen.

3.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der Software PRISM® Version 6.01 der Firma GraphPad Software, Inc. Die Datensätze der qPCR wurden vor der statistischen Auswertung einem Grubbs-Ausreißer-Test unterzogen (Grubbs, 1969). Statistisch signifikante Ausreißer wurden anschließend von der statistischen Auswertung ausgeschlossen. Für Datensätze mit einer Variablen wurde One-way ANOVA, für Datensätze mit zwei Variablen Two-way ANOVA mit Vorauswahl (preselected groups) durchgeführt. Ein P-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet ($P < 0,05 = *$, $P < 0,01 = **$, $P < 0,001 = ***$). Signifikanzen im Bezug zu der entsprechenden Kontrollgruppe wurde mit einer # markiert ($P < 0,05 = \#$, $P < 0,01 = \#\#$, $P < 0,001 = \#\#\#$).

4 Ergebnisse

4.1 Verifizierung des Verlusts von HIF-1 α in Makrophagen der Versuchstiere

Um nachzuweisen, dass das *Cre/loxP*-System zu dem gewünschten *Knock-out* von HIF-1 α in myeloischen Zellen führte, wurden BMDM aus HIF-1 $\alpha^{+/+}$ - und LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren generiert, unter hypoxischen Bedingungen stimuliert und RNA- und Protein-Proben entnommen. Anschließend wurde Exon 2 der HIF-1 α -Untereinheit und das HIF-1-Zielgen *glut-1* mittels qPCR sowie das HIF-1 α -Protein mittels Western-Blot nachgewiesen.

Mittels qPCR ergab sich auf mRNA-Level eine *Knock-out* Effizienz von ca. 80 % in BMDM der LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere verglichen mit BMDM der HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere (siehe Abbildung 4.1 A). Auch das HIF-1-Zielgen *glut-1* war in BMDM der LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere um ca. 50 % verringert verglichen mit BMDM der HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere (siehe Abbildung 4.1 B). Auf Protein-Ebene konnte mittels Western-Blot deutlich visualisiert werden, dass die HIF-1 α -Untereinheit in BMDM von LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren aufgrund des fehlenden Exon 2 eine geringere Größe hat und auf einer geringeren Höhe detektierbar war als die HIF-1 α -Untereinheit in BMDM von HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren (siehe Abbildung 4.1 C).

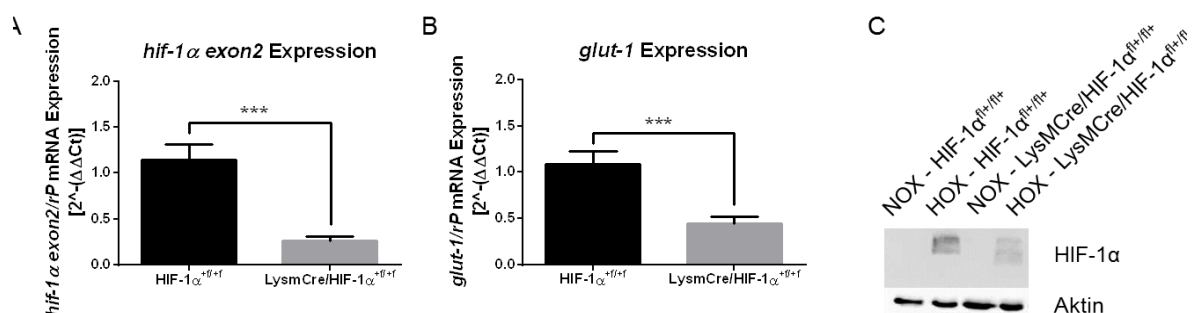


Abbildung 4.1 Nachweis der *Knock-out* Effizienz: Zum Nachweis der *Knock-out* Effizienz wurden RNA- und Proteinproben von 6h normoxisch (NOX, 21 % O₂) oder hypoxisch (HOX, 1 % O₂) kultivierten BMDM von HIF-1 $\alpha^{+/+}$ - und LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren mittels qPCR auf *hif-1α* exon 2 und *glut-1* bzw. mittels Western-Blot auf HIF-1 α untersucht. Es ergab sich eine ca. 80 %ige *Knock-out* Effizienz für *hif-1α* exon 2 (A) und eine ca. 50 %ige Verminderung der Expression des HIF-1-Zielgens *glut-1* (B). Im Western-Blot konnte ein verkürztes HIF-1 α Protein in BMDM der LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere nachgewiesen werden (C).

4.2 Krankheitsbild der DSS-induzierten Colitis

Um das Krankheitsbild der CED im Tiermodell Maus zu untersuchen, wurde die gut reproduzierbare DSS-induzierte Colitis gewählt. Die Colitis wurde ausgelöst, indem mindestens 10 Wochen alte HIF-1 $\alpha^{+/+}$ - oder LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere mit 2,5 % DSS für 4 bis 6 Tage behandelt wurden.

4.2.1 Induktion einer Colitis nach Behandlung mit 2,5 % DSS

Die Veränderungen des Körpergewichts wurden täglich aufgezeichnet. Das Ausgangsgewicht an Tag 0 wurde dabei als 100 % Körpergewicht gesetzt und alle anderen ermittelten Gewichte darauf bezogen.

Die Tiere der Kontrollgruppen zeigten während der gesamten Versuchsdauer wie erwartet nur geringe Schwankungen von höchstens 3-5 % des Ausgangsgewichts und keine eindeutige Zu- oder Abnahme des Körpergewichts. Bei den DSS-behandelten Tieren kam es während der ersten 4 Tage ebenfalls zu Schwankungen von bis zu 5 % des Ausgangsgewichts, aber zu keinem eindeutig Colitis-assoziierten Gewichtsverlust.

Eine eindeutig Colitis-assoziierte Gewichtsabnahme konnte ab Tag 4 beobachtet werden, weshalb der DSS-Versuch für 4 Tage somit keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen erbrachte (siehe Abbildung 4.2, 4d).

Bei dem DSS-Versuch für 5 Tage zeigten die HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere eine stärkere Gewichtsabnahme als die LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere (siehe Abbildung 4.2, 5d).

Auch der DSS-Versuch für 6 Tage zeigte eine stärkere Gewichtsabnahme bei den HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren (siehe Abbildung 4.2, 6d).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere nach 6 Tagen DSS-Behandlung deutlich mehr Körpergewicht, insgesamt maximal 19 %, verloren haben als LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere, welche maximal 14 % Körpergewicht verloren haben (siehe Abbildung 4.2).

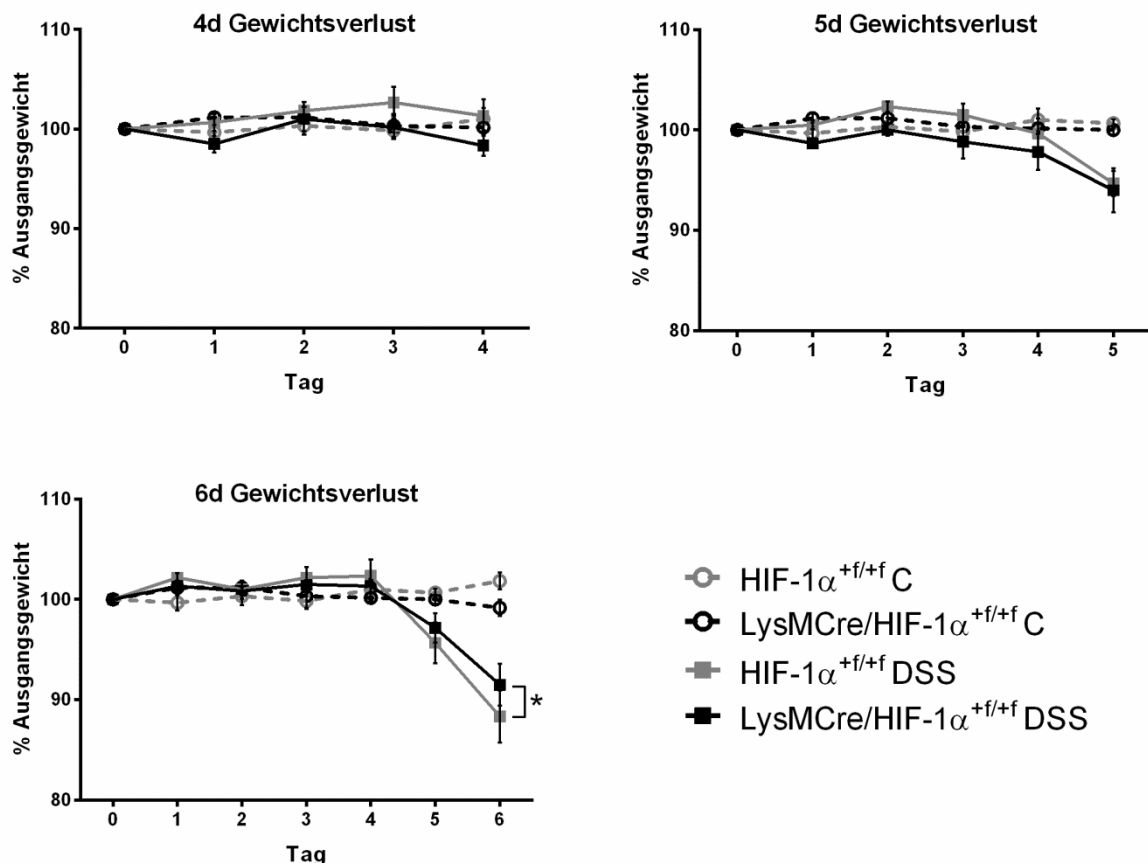


Abbildung 4.2 Gewichtsverlust im Krankheitsverlauf der DSS-induzierten Colitis: HIF-1 $\alpha^{+/+/+}$ - und LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+/+}$ -Tiere wurden 4, 5 und 6 Tage (4d, 5d, 6d) mit 2,5 % DSS behandelt und täglich das Gewicht aufgezeichnet. Der Gewichtsverlust wurde prozentual zum Ausgangsgewicht beurteilt und ist getrennt für die verschiedenen Behandlungszeiträume dargestellt. C: n=5. DSS: n=6.

Neben dem Körpergewicht wurden außerdem Stuhlbeschaffenheit und Blut im Stuhl täglich kontrolliert und aufgezeichnet. Diese Parameter konnten zusammen mit dem Wert des Gewichtsverlusts genutzt werden, um den DAI zu bestimmen. Der DAI ermöglicht eine Aussage über die Schwere der Colitis und kann einen maximalen Wert von 12 erreichen.

Wie auch schon beim Gewichtsverlust, zeigten die Tiere der Kontrollgruppen wie erwartet keine Anzeichen einer Colitis und somit keine Zunahme des DAI während der gesamten Versuchsdauer. Die DSS-behandelten Tiere zeigten ab Tag 3 der DSS-Behandlung eine Zunahme des DAI (siehe Abbildung 4.3).

Bei dem DSS-Versuch für 4 Tage zeigten die LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+/+}$ -Tiere mit maximalen DAI-Einzelwerten von 8 eine stärkere Colitis als die HIF-1 $\alpha^{+/+/+}$ -Tiere mit maximalen DAI-Einzelwerten von 4 (siehe Abbildung 4.3, 4d).

Bei dem DSS-Versuch für 5 Tage zeigte sich an Tag 4 ein ähnliches Bild des DAI wie bei dem DSS-Versuch für 4 Tage. Die erreichten DAI-Werte an Tag 4 waren jedoch geringer als bei dem DSS-Versuch für 4 Tage. An Tag 5 zeigten die HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere mit maximalen DAI-Einzelwerten von 9 eine stärkere Colitis als die LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere mit maximalen DAI-Einzelwerten von 8 (siehe Abbildung 4.3, 5d).

Bei dem DSS-Versuch für 6 Tage zeigten die HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere zu allen Zeitpunkten der DSS-Behandlung einen höheren DAI als die LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere.

An Tag 6 konnte bei den HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren maximale DAI-Einzelwerte zwischen 5-11 ermittelt werden. Bei den LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren hingegen wurde nur Einzelwerten zwischen 5-10 erreicht. Zusammenfassend lässt sich für die 6 Tage andauernde DSS-Behandlung sagen, dass die HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere eine stärkere Colitis als die LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere zeigten (siehe Abbildung 4.3, 6d).

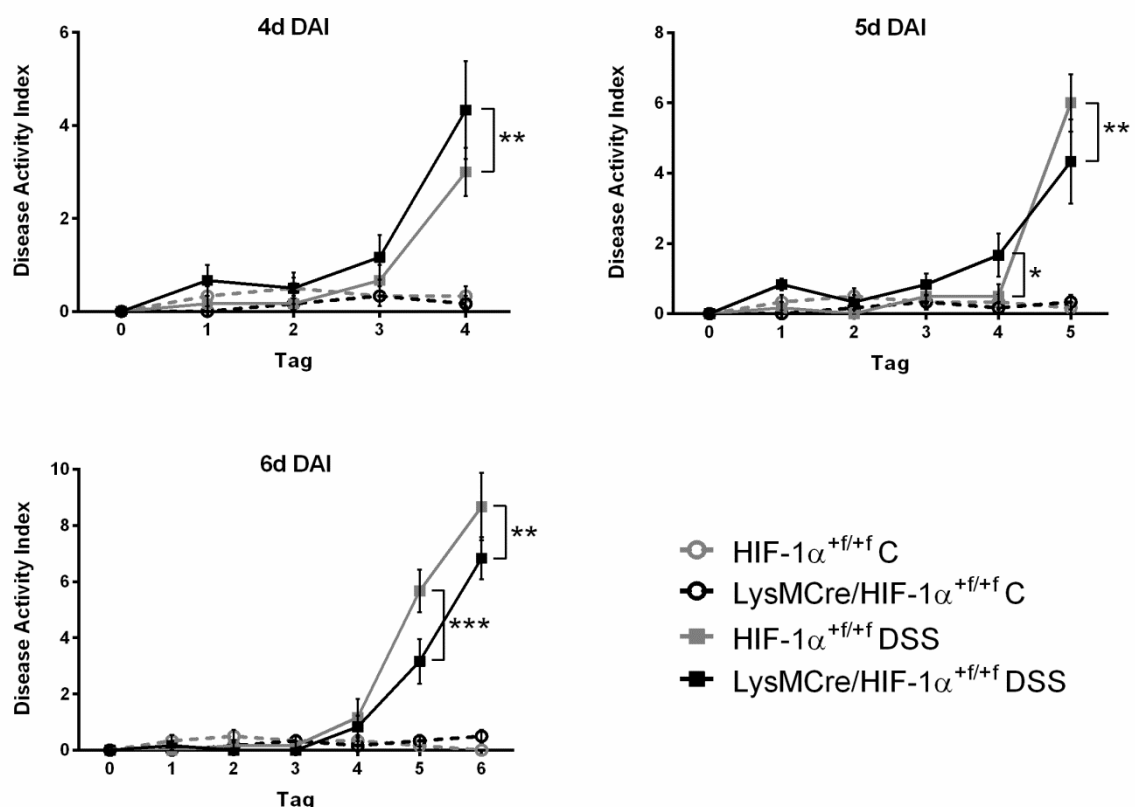


Abbildung 4.3 DAI im Krankheitsverlauf der DSS-induzierten Colitis: HIF-1 $\alpha^{+/+}$ - und LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere wurden 4, 5 und 6 Tage (4d, 5d, 6d) mit 2,5 % DSS behandelt und täglich der DAI aufgezeichnet. Der DAI konnte einen maximalen Wert von 12 erreichen und wird getrennt für die verschiedenen Behandlungszeiträume dargestellt. C: n=5. DSS: n=6.

4.2.2 Milz-Struktur nach Induktion einer Colitis mit 2,5 % DSS

Am letzten Versuchstag wurden die Tiere durch cervikale Dislokation getötet und verschiedene Organe konnten zur weiteren Untersuchung entnommen werden. Die Milz wurde nach Eröffnung der Bauchhöhle lokalisiert, entnommen, vermessen und gewogen. Es zeigten sich weder Unterschiede in der Größe (siehe Abbildung 4.4 A), noch im Gewicht (siehe Abbildung 4.4 B), weder zwischen der Kontrollgruppe und der DSS-behandelten Gruppe, noch innerhalb der Gruppen zwischen $\text{HIF-1}\alpha^{+/+}$ - und $\text{LysMCre/HIF-1}\alpha^{+/+}$ -Tieren.

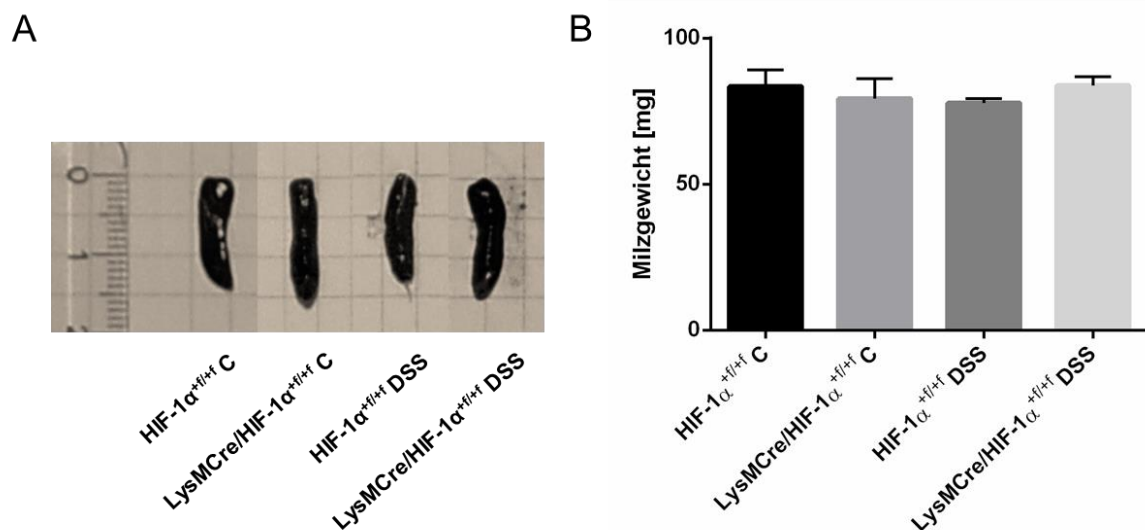


Abbildung 4.4 Makroskopischer Einfluss von DSS auf die Milz: Die DSS-Behandlung für 6 Tage mit 2,5 % DSS zeigte keinen Effekt auf die Größe (A) oder das Gewicht (B) der Milz. Weder zwischen der Kontrollgruppe (C) und der DSS-behandelten Gruppe (DSS) noch zwischen den $\text{HIF-1}\alpha^{+/+}$ - und $\text{LysMCre/HIF-1}\alpha^{+/+}$ -Tieren.

Nach makroskopischer Beurteilung der Milz, konnte diese für weitere histologische Untersuchungen konserviert werden. H&E-gefärbte Gewebeschnitte der Milz zeigten nach mikroskopischer Untersuchung keine Unterschiede in Anzahl und Größe der Lymphfollikel der roten Pulpa, weder zwischen der Kontrollgruppe und der DSS-behandelten Gruppe, noch innerhalb der Gruppen zwischen $\text{HIF-1}\alpha^{+/+}$ - und $\text{LysMCre/HIF-1}\alpha^{+/+}$ -Tieren (siehe Abbildung 4.5).

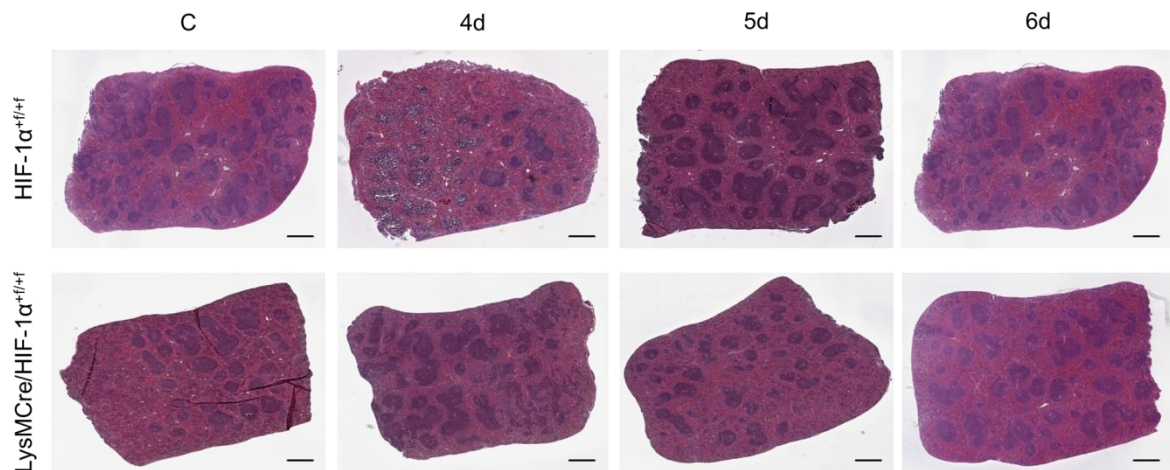


Abbildung 4.5 Mikroskopischer Befund der Milz: H&E-gefärbte Milzschnitte zeigten weder zwischen HIF-1 $\alpha^{+/+}$ - und LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren noch zwischen Kontrollbedingungen (C) und DSS-Behandlung für 4, 5 oder 6 Tage (4d, 5d, 6d) Unterschiede auf. (Vergrößerung: 20x. Maßstabsbalken = 500 μ m).

4.2.3 Auswirkung der DSS-Behandlung auf das Colon

Auch das Colon wurde am letzten Versuchstag lokalisiert, an Caecum und Rectum abgetrennt, entnommen und entleert. Anschließend konnten Länge und Gewicht bestimmt werden. Die Messung der Colon-Länge ergab eine deutliche Verkürzung des Colons nach DSS-Behandlung (siehe Abbildung 4.6 A). Ebenso war das Verhältnis von Colon-Gewicht zu Colon-Länge nach DSS-Verabreichung deutlich erhöht (siehe Abbildung 4.6 B). Zwischen HIF-1 $\alpha^{+/+}$ - und LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren konnten jedoch sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der DSS-behandelten Gruppe keine Unterschiede festgestellt werden.

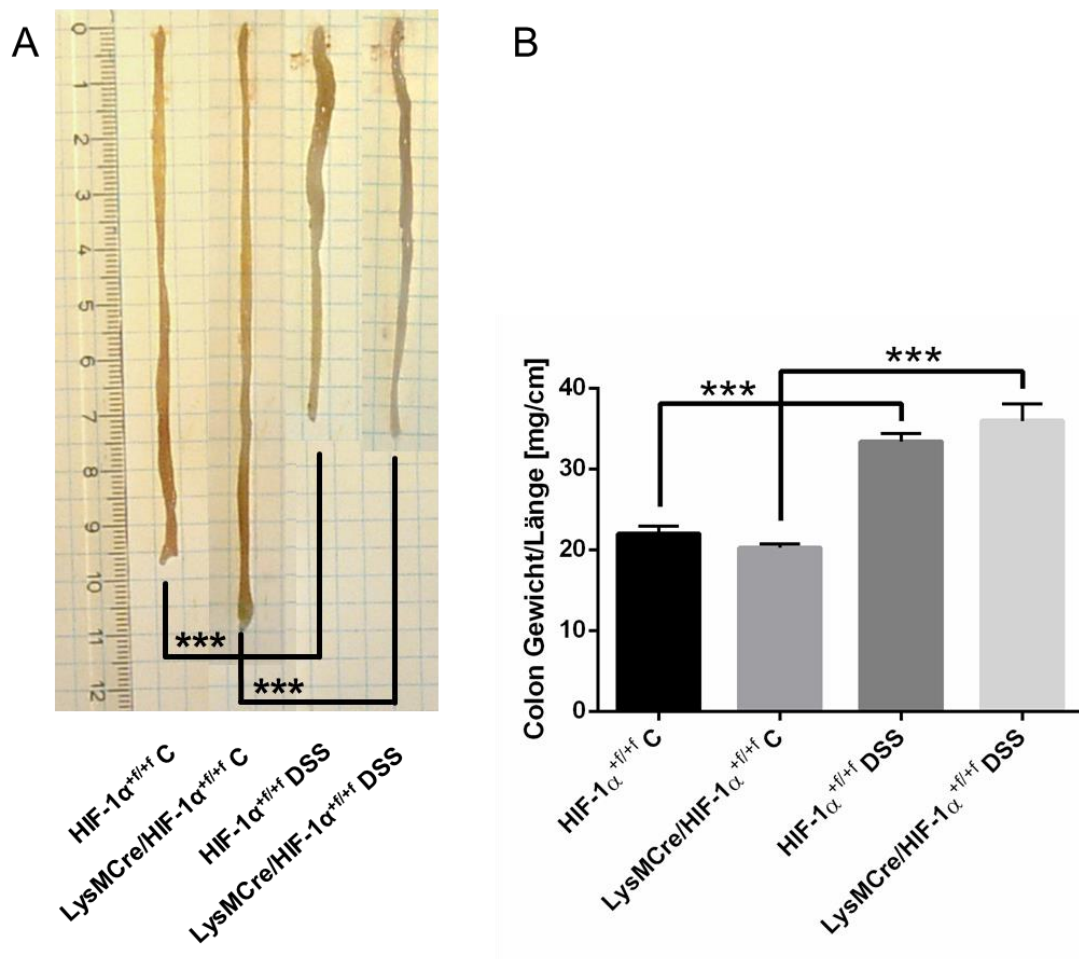


Abbildung 4.6 Makroskopischer Einfluss von DSS auf das Colon: DSS-behandelte Tiere (DSS) zeigten im Vergleich zu Tieren der Kontrollgruppe (C) ein signifikant verkürztes Colon (A). Das Verhältnis von Colon-Gewicht zu Colon-Länge war bei den DSS-behandelten Tieren signifikant erhöht (B).

Wie zuvor die Milz, konnte auch das Colon nach makroskopischer Beurteilung für weitere histologische Untersuchungen konserviert werden. H&E-gefärbte Gewebeschnitte des Colons wurden mikroskopisch aufgenommen und anschließend die Gewebeschädigung mit Hilfe des Histologie-Scores bestimmt.

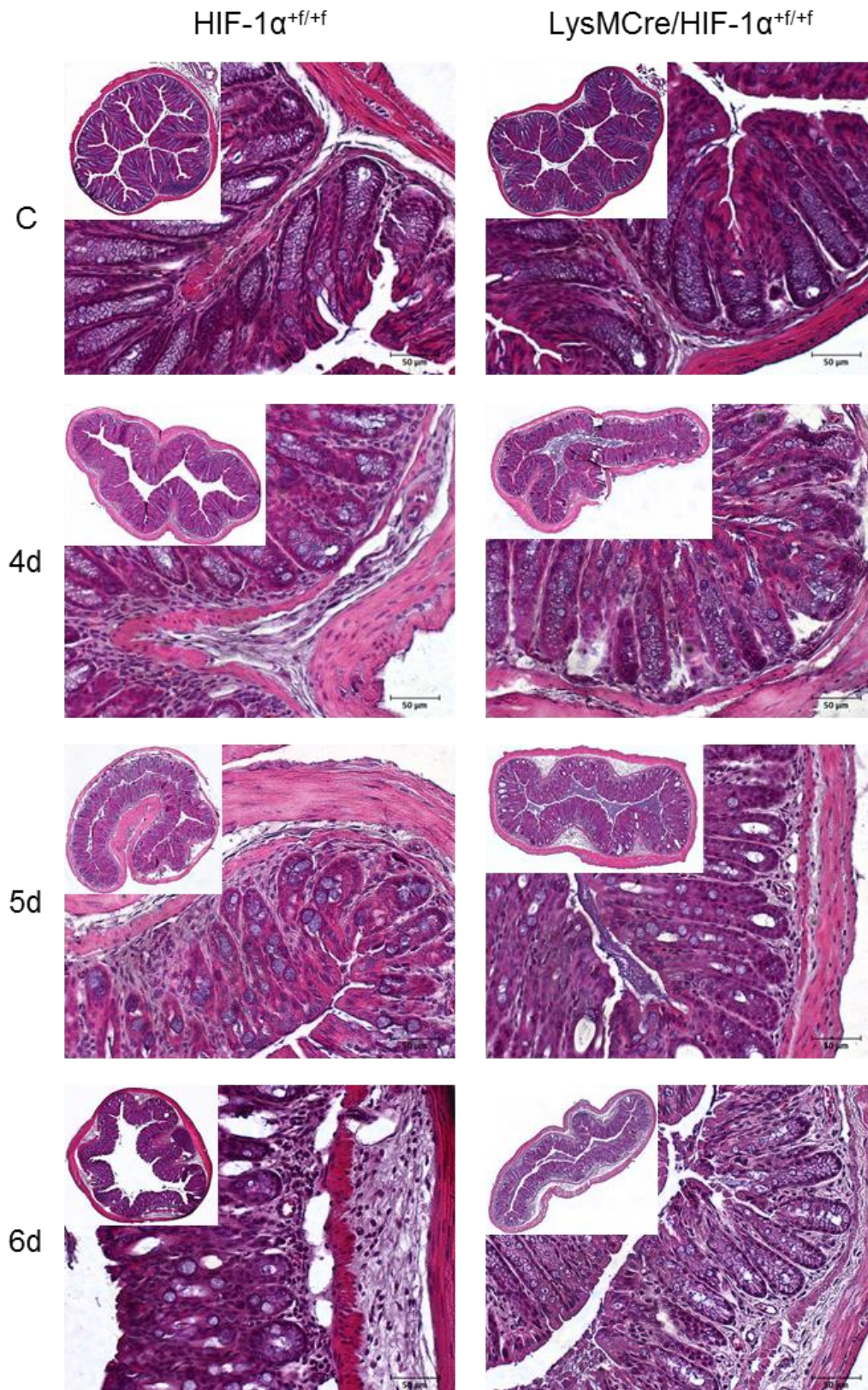


Abbildung 4.7 Einfluss von DSS auf das Colongewebe: Exemplarisch dargestellt sind H&E-gefärbte Gewebeschnitte des Colons von HIF-1 $\alpha^{+/+}$ - und LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren der Kontrollgruppe (C) und der für 4, 5 und 6 Tage DSS-behandelten Gruppen (4d, 5d, 6d). Mit zunehmender Zeit der DSS-Behandlung ist deutlich der Verlust der Colontypischen Struktur zu beobachten. (Vergrößerung Übersichtsbild: 10x. Vergrößerung Detailbild: 20x. Maßstabsbalken = 50 μ m).

Die H&E-gefärbten Gewebeschnitte der HIF-1 $\alpha^{+/+f}$ - und LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+f}$ -Tiere der Kontrollgruppe zeigten die typische Gewebestruktur eines gesunden Colons (siehe Abbildung 4.7, C). Nach 4 Tagen DSS-Behandlung waren bereits vermehrt infiltrierende Immunzellen in der *Lamina propria mucosae* zu identifizieren. Bei den HIF-1 $\alpha^{+/+f}$ -Tieren waren diese öfter als bei den LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+f}$ -Tieren zu vernehmen (siehe Abbildung 4.7, 4d). Nach 5 Tagen DSS-Behandlung nahm die Zahl dieser infiltrierten Immunzellen weiter zu, so dass es zu ersten Schäden der Colon-Gewebestruktur kam. Des Weiteren bildeten sich vereinzelt erste Ödeme. Zwischen HIF-1 $\alpha^{+/+f}$ - und LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+f}$ -Tieren waren keine eindeutigen Unterschiede zu erkennen (siehe Abbildung 4.7, 5d). Nach 6 Tagen DSS-Behandlung waren eine massive Infiltration von Immunzellen und eine deutliche Schädigung der Colon-Gewebestruktur bis hin zum kompletten Verlust der Gewebestruktur des Colons zu erkennen. Die Colon-Gewebeschädigung erschien dabei in den HIF-1 $\alpha^{+/+f}$ -Tieren deutlich stärker als in den LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+f}$ -Tieren (siehe Abbildung 4.7, 6d).

Anhand der H&E-gefärbten Gewebeschnitte des Colons konnte der Histologie-Score zur quantifizierbaren Beurteilung der Gewebeschädigung ermittelt werden. Dabei konnte ein maximaler Wert von 10 erreicht werden.

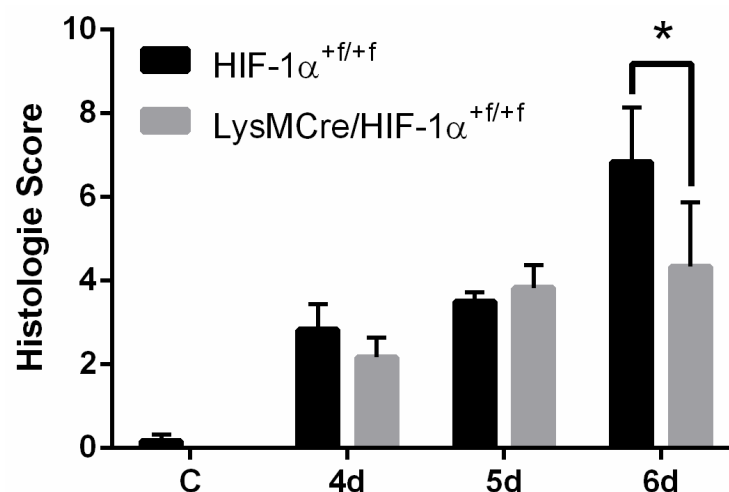


Abbildung 4.8 Beurteilung der Colon-Schädigung: H&E-gefärbte Gewebeschnitte des Colons von HIF-1 $\alpha^{+/+f}$ - und LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+f}$ -Tieren der Kontrollgruppe (C) und der für 4, 5 und 6 Tage DSS-behandelten Gruppen (4d, 5d, 6d) wurden mit Hilfe des histologischen Scores ausgewertet. Mit zunehmender Zeit der DSS-Behandlung ist eine Zunahme des histologischen Scores zu beobachten. Nach 6 Tagen DSS-Behandlung zeigten die HIF-1 $\alpha^{+/+f}$ -Tiere einen deutlich stärkeren histologischen Score als die LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+f}$ -Tiere. C: n=5. DSS: n=6.

Die Tiere der Kontrollgruppen zeigten auch hier, wie erwartet, keine Gewebeschädigung und daher einen Score-Wert von nahezu 0 (0,1). Nach 4 und 5 Tagen DSS-Behandlung verzeichneten beide Tiergruppen Score-Werte von ca. 3. Erst an Tag 6 der DSS-Behandlung waren deutliche Unterschiede zwischen HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ - und LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -Tieren zu beobachten. HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -Tiere zeigten eine deutlich stärkere Gewebeschädigung des Colons mit Score-Werten von ca. 7 im Gegensatz zu LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -Tiere, welche Score-Werte von ca. 4 aufwiesen (siehe Abbildung 4.8).

Zur weiteren Visualisierung der Colon-Gewebeschädigung wurde eine Siriusrot-Färbung durchgeführt, hierdurch werden Kollagenfasern angefärbt, die auf Fibroseareale hindeuten.

In Colon-Gewebeschnitten von HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ - und LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -Tieren der Kontrollgruppe war das subepitheliale, kollagene Band mit Hilfe der Siriusrot-Färbung in der *Tela submucosa* deutlich zu erkennen (siehe Abbildung 4.9, C). Nach 4 Tagen DSS-Behandlung erschien die Intensität dieser Färbung in HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ - und LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -Tieren verstärkt (siehe Abbildung 4.9, 4d). Bereits nach 5 Tagen DSS-Behandlung waren neben der Siriusrot-gefärbten *Tela submucosa* auch gefärbte Areale im unteren Drittel der *Tunica mucosa* zu erkennen. Dies war besonders bei den HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -Tieren vermehrt zu beobachten (siehe Abbildung 4.9, 5d).

Mit zunehmender Colon-Gewebeschädigung waren in beiden DSS-behandelten Gruppen Siriusrot-gefärbte Areale in der *Tunica mucosa* zu erkennen. Bei den HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -Tieren war diese sehr intensiv ausgeprägt und betraf die gesamte *Tunica mucosa*. Bei den LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -Tieren dagegen war nur in der unteren Hälfte der *Tunica mucosa* eine schwache Siriusrot-Färbung zu beobachten (siehe Abbildung 4.9, 6d).

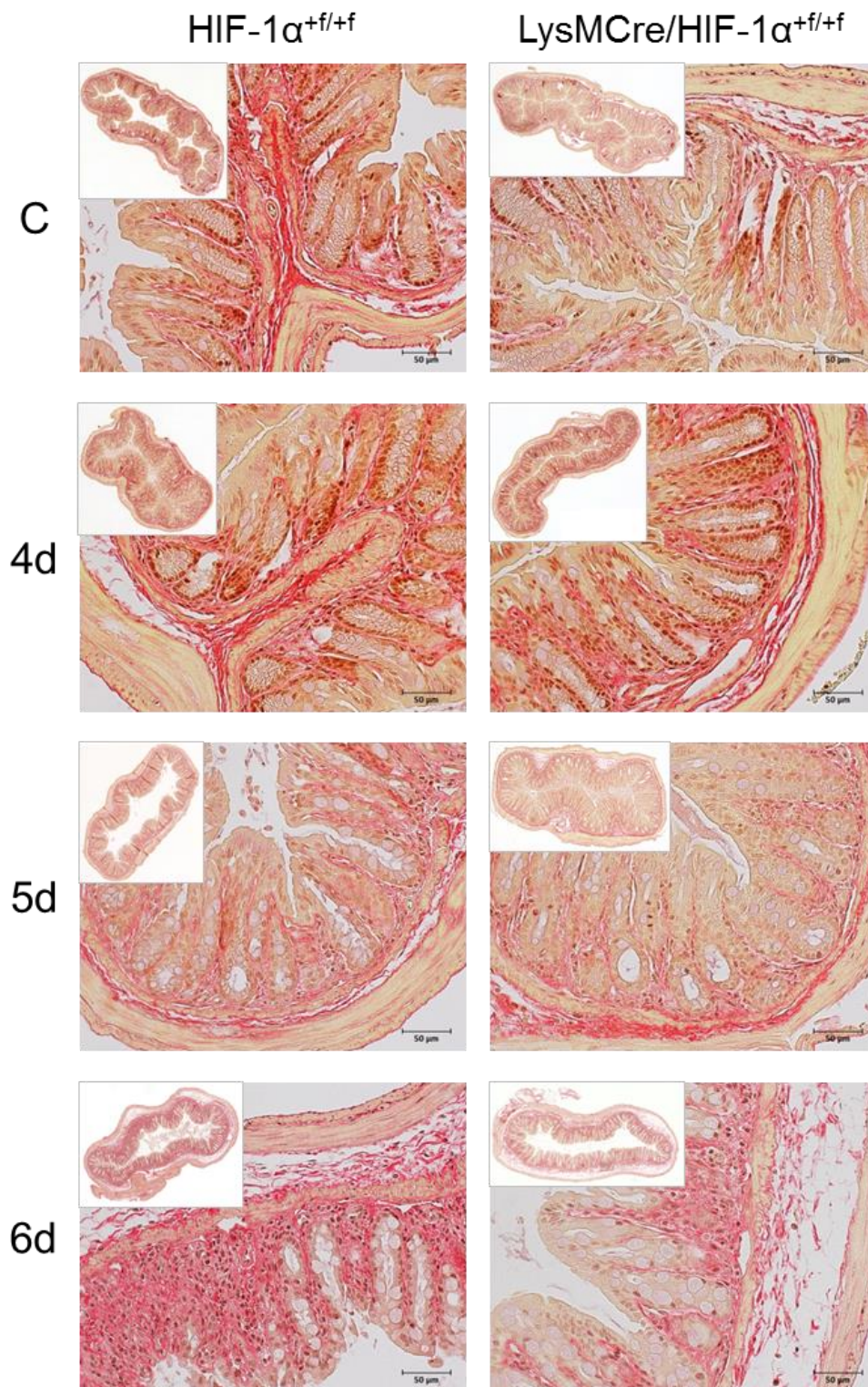


Abbildung 4.9 Fibroseareale im Colon nach DSS-Behandlung: Die Visualisierung von Fibrosearealen erfolgte histochemisch mit Gewebeschnitten des Colons mit Hilfe der Siriusrot-Färbung. Dargestellt sind repräsentative Bilder von HIF-1 $\alpha^{+/+}$ - und LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren aus der Kontrollgruppe (C), sowie der für 4, 5 und 6 Tage DSS-behandelten Tiere (4d, 5d, 6d). Neben der Siriusrot-Färbung (rot) erfolgte eine Gegenfärbung mit Eosin (gelb-orange). Nach 6 Tagen DSS-Behandlung war eine Siriusrot-Färbung in der gesamten *Tunica mucosa* zu erkennen. (Vergrößerung Übersichtsbild: 10x. Vergrößerung Detailbild: 20x. Maßstabsbalken = 50 μ m).

4.3 Hypoxie und HIF-1 im Colon der DSS-induzierten Colitis

Durch *Hypoxyprobe*-Färbung von Colon-Gewebeschnitten der HIF-1 $\alpha^{+/+}$ - und LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere der Kontrollgruppe und der für 6 Tage DSS-behandelten Gruppe konnten hypoxische Areale lokalisiert werden. Dies war von Interesse, da DSS-Behandlung über die chemische Zerstörung der *Lamina epithelialis mucosae* und das Eindringen luminaler Pathogene zu Entzündung führt und Entzündungen in vielen Fällen durch Hypoxie charakterisiert sind. Außerdem ist im Darm eine physiologische Gewebe-Hypoxie vorzufinden.

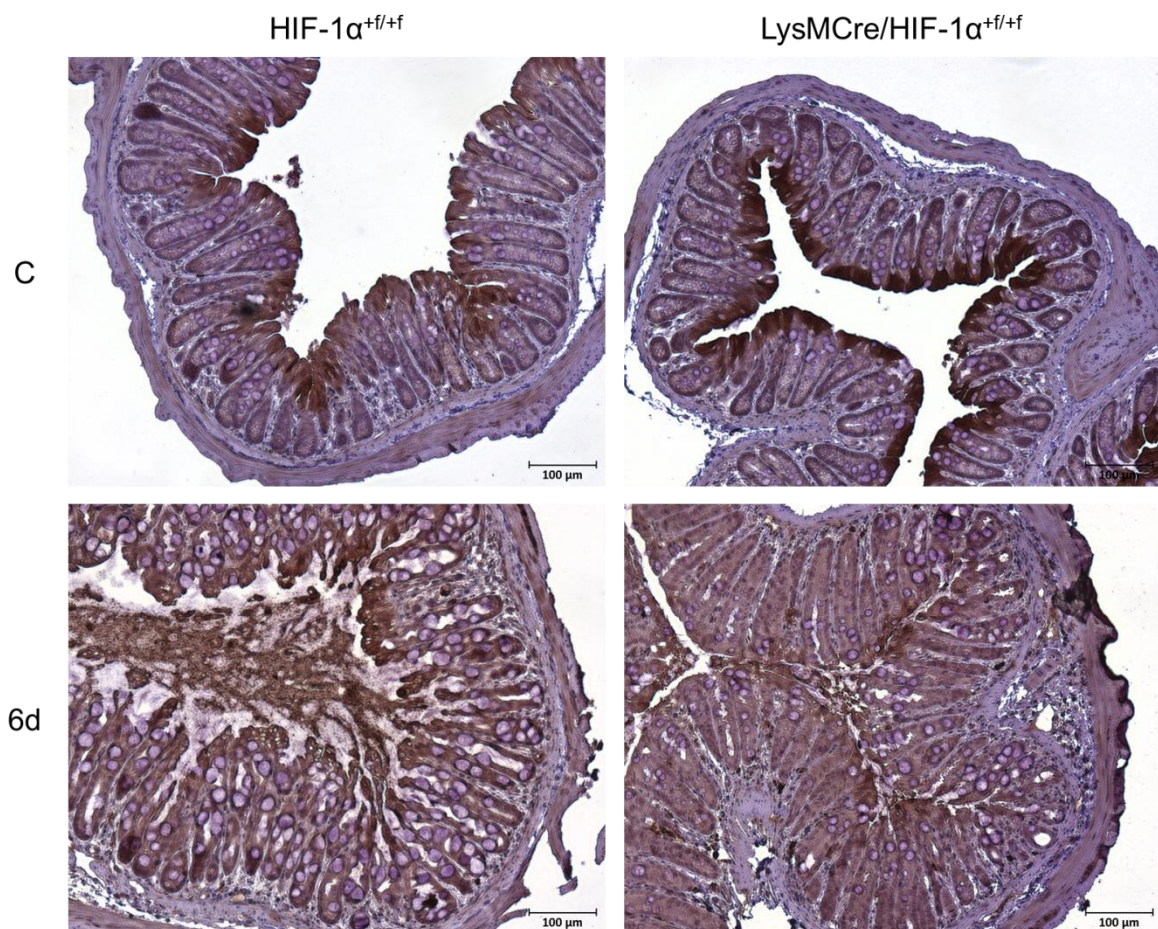


Abbildung 4.10 Hypoxie im Colon der DSS-induzierten Colitis: Exemplarisch dargestellt sind *Hypoxyprobe*-gefärbte Gewebeschnitte des Colons von HIF-1 $\alpha^{+/+}$ - und LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren der Kontrollgruppe (C) und der für 6 Tage DSS-behandelten Gruppen (6d). Nach DSS-Behandlung war eine deutliche Erweiterung der *Hypoxyprobe*-gefärbten Areale von der *Lamina epithelialis mucosae* bis tief in die *Tunica mucosa* zu beobachten. (Vergrößerung: 10x. Maßstabsbalken = 100 μ m).

Hypoxyprobe-gefärbte Colon-Gewebeschnitte der HIF-1 $\alpha^{+/+}$ - und LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere der Kontrollgruppen zeigten ausschließlich eine deutlich positiv gefärbte *Lamina epithelialis mucosae* (siehe Abbildung 4.10, C). Bei den

Tieren der DSS-behandelten Gruppen war die gesamte *Tunica mucosa* und auch Bereiche der *Tela submucosa* Hypoxyprobe-gefärbt (siehe Abbildung 4.10, 6d). Zwischen $\text{HIF-1}\alpha^{+/+/-}$ - und $\text{LysMCre/HIF-1}\alpha^{+/+/-}$ -Tieren waren jedoch keine eindeutigen Unterschiede zu erkennen.

Außerdem konnten Colon-Gewebeschnitte von $\text{HIF-1}\alpha^{+/+/-}$ - und $\text{LysMCre/HIF-1}\alpha^{+/+/-}$ -Tieren mit einem Antikörper für HIF-1 α immunhistochemisch gefärbt und somit HIF-1 α im Gewebe identifiziert werden.

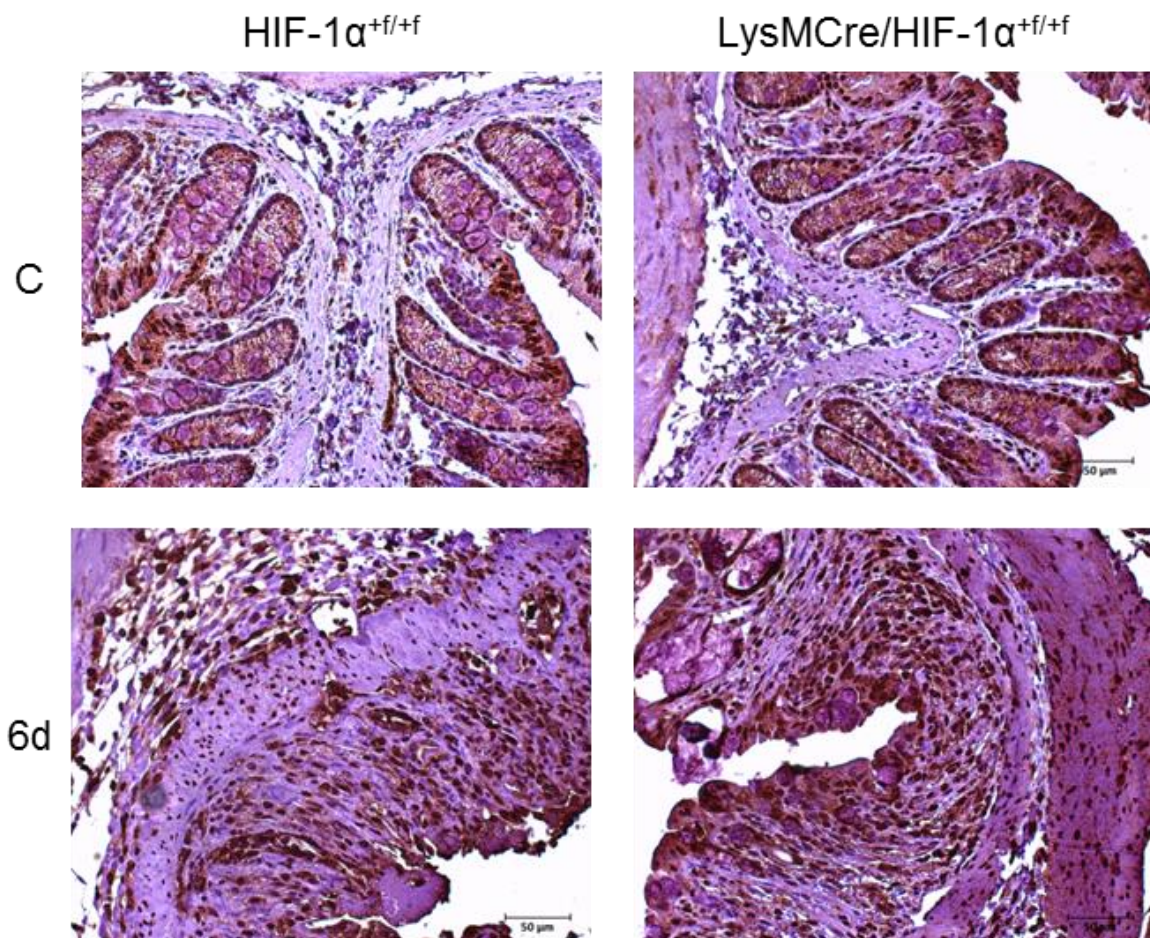


Abbildung 4.11 HIF-1 α im Colon der DSS-induzierten Colitis: Exemplarisch dargestellt sind HIF-1 α -gefärbte Gewebeschnitte des Colons von $\text{HIF-1}\alpha^{+/+/-}$ - und $\text{LysMCre/HIF-1}\alpha^{+/+/-}$ -Tieren der Kontrollgruppe (C) und der für 6 Tage DSS-behandelten Gruppen (6d). Nach DSS-Behandlung war eine deutliche Zunahme der HIF-1 α -gefärbten Zellkerne bis tief in die *Tela submucosa* zu beobachten. (Vergrößerung: 20x. Maßstabsbalken = 50 μm).

Bei den Colon-Gewebeschnitten der $\text{HIF-1}\alpha^{+/+/-}$ - und $\text{LysMCre/HIF-1}\alpha^{+/+/-}$ -Tiere der Kontrollgruppen waren HIF-1 α -gefärbte Zellkerne in der *Lamina epithelialis mucosae* und vereinzelt auch in der *Tela submucosa* zu identifizieren (siehe Abbildung 4.11, C). In Colon-Gewebeschnitten DSS-behandelter $\text{HIF-1}\alpha^{+/+/-}$ - und $\text{LysMCre/HIF-1}\alpha^{+/+/-}$ -Tiere waren deutlich vermehrt HIF-1 α -gefärbte Zellkerne

sichtbar, die sich in der gesamten *Tunica mucosa* und *Tela submucosa* verteilen. Zwischen $\text{HIF-1}\alpha^{+/+/-}$ - und $\text{LysMCre/HIF-1}\alpha^{+/+/-}$ -Tieren waren keine eindeutigen Unterschiede festzustellen (siehe Abbildung 4.11, 6d).

4.4 Reaktion auf die DSS-Behandlung

Da die DSS-induzierte Colitis zu unterschiedlich ausgeprägten Krankheitsbildern zwischen $\text{HIF-1}\alpha^{+/+/-}$ - und $\text{LysMCre/HIF-1}\alpha^{+/+/-}$ -Tieren führte, sollte dies mithilfe weiterer histologischer und mikrobiologischer Methoden untersucht werden.

4.4.1 Mucine des Colons während DSS-induzierter Colitis

Mucine bilden die erste schützende Barriere des Magen-Darm-Trakts und waren deshalb für nähere Untersuchungen von Interesse. Dabei stellen MUCIN-2 das am häufigsten sezernierte und MUCIN-3 ein membranständiges Mucin des Darms dar und wurden daher mittels qPCR in aus Colongewebe gewonnener RNA quantitativ bestimmt.

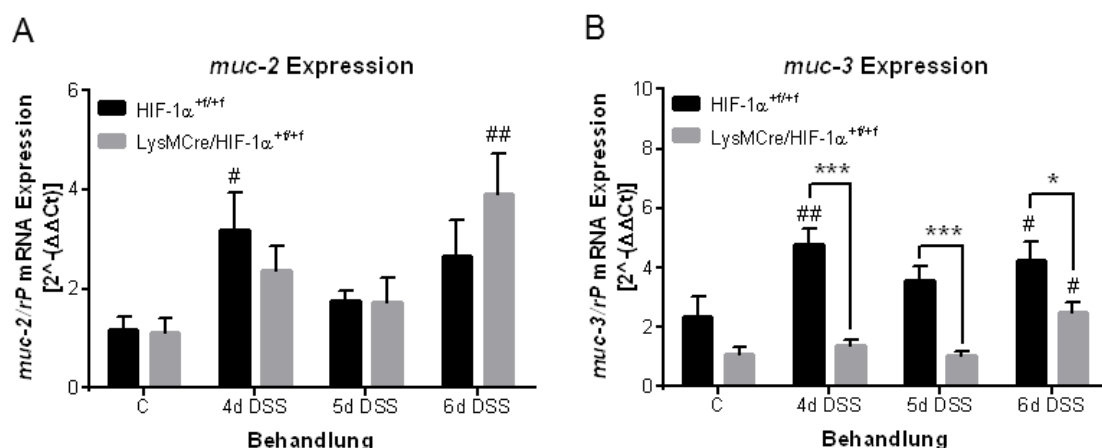


Abbildung 4.12 Die protektiven Mucine im Verlauf der DSS-induzierten Colitis: Das Vorkommen des protektiven MUCIN-2 und MUCIN-3 im Colongewebe von $\text{HIF-1}\alpha^{+/+/-}$ - und $\text{LysMCre/HIF-1}\alpha^{+/+/-}$ -Tieren wurde mittels qPCR mit *muc-2* und *muc-3* Primern quantitativ erfasst. Dargestellt sind die Kontrollgruppen (C) und die für 4, 5 und 6 Tage DSS-behandelten Gruppen (4d, 5d, 6d DSS). Mit zunehmender DSS-Behandlung ist eine gesteigerte *muc-2* Expression zu beobachten, die in Proben der $\text{LysMCre/HIF-1}\alpha^{+/+/-}$ -Tiere an Tag 6 stärker war als bei Proben der $\text{HIF-1}\alpha^{+/+/-}$ -Tiere (A). Die *muc-3* Expression dagegen war an allen Tagen der DSS-Behandlung ausschließlich in Proben der $\text{HIF-1}\alpha^{+/+/-}$ -Tiere erhöht (B). C: n=5. DSS: n=6.

Nach 4 und 5 Tagen DSS-Behandlung konnte sowohl in den Proben der $\text{HIF-1}\alpha^{+/+/-}$ - als auch der $\text{LysMCre/HIF-1}\alpha^{+/+/-}$ -Tiere eine Erhöhung der *muc-2* Expression beobachtet werden. Nach 6 Tagen DSS-Behandlung zeigten die Proben der $\text{HIF-1}\alpha^{+/+/-}$ -Tiere eine ähnlich erhöhte *muc-2* Expression wie nach

4 und 5 Tage DSS-Behandlung. Die Proben der LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -Tiere zeigten jedoch eine 2-fach erhöhte *muc-2* Expression im Vergleich zu den Proben der 4 und 5 Tage DSS-behandelten Gruppen. Diese war signifikant erhöht im Bezug zu der Kontrollgruppe (siehe Abbildung 4.12 A).

Die *muc-3* Expression war zu allen Zeitpunkten der DSS-Behandlung in Proben der HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -Tiere signifikant erhöht im Vergleich zu den Kontrolltieren und den LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -Tieren. Die Proben der LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -Tiere zeigten lediglich nach 6 Tagen DSS-Behandlung eine leichte Erhöhung der *muc-3* Expression (siehe Abbildung 4.12 B).

Neben der Expression von *muc-2* konnte das Protein MUCIN-2 immunhistochemisch nachgewiesen werden. Gewebeschnitte des Colons wurden dafür mit einem Antikörper gegen MUCIN-2 gefärbt und mikroskopisch aufgenommen.

Bei den Tieren der Kontrollgruppe war ein gemäßigtes Auftreten von MUCIN-2 festzustellen. Das Signal für MUCIN-2 bildete dabei kleine, runde Strukturen, welche mit den Becherzellen übereinstimmten und in der gesamten *Tunica mucosa* verteilt waren (siehe Abbildung 4.13, C). Zwischen HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ - und LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -Tieren waren dabei keine Unterschiede festzustellen.

Bei den für 4 und 5 Tage DSS-behandelten Tieren erschienen mehr MUCIN-2 gefärbte Becherzellen als bei den Kontrolltieren. In manchen Bereichen waren außerdem größere Becherzellen zu sehen (siehe Abbildung 4.13, 4d und 5d). Auch hier gab es keine Unterschiede zwischen HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ - und LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -Tieren.

Nach 6 Tagen DSS-Behandlung waren in den Colon-Gewebeschnitten deutlich vermehrt und größere MUCIN-2 gefärbte Becherzellen zu erkennen. Diese waren bei den HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ - Tieren hauptsächlich lumenwärts im ersten Drittel der *Tunica mucosa* und nur selten im unteren Bereich der *Tunica mucosa* zu finden. Bei starker Colon-Gewebeschädigung waren keine MUCIN-2 gefärbten Becherzellen in der *Tunica mucosa* zu erkennen. Bei den LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -Tieren erschienen die MUCIN-2 gefärbten Becherzellen deutlich größer und in vermehrter Anzahl in nahezu allen Bereichen der *Tunica mucosa*. Jedoch waren auch hier bei sehr starker Colon-Gewebeschädigung (Pfeile) keine Becherzellen in der *Tunica mucosa* zu erkennen (siehe Abbildung 4.13, 6d).

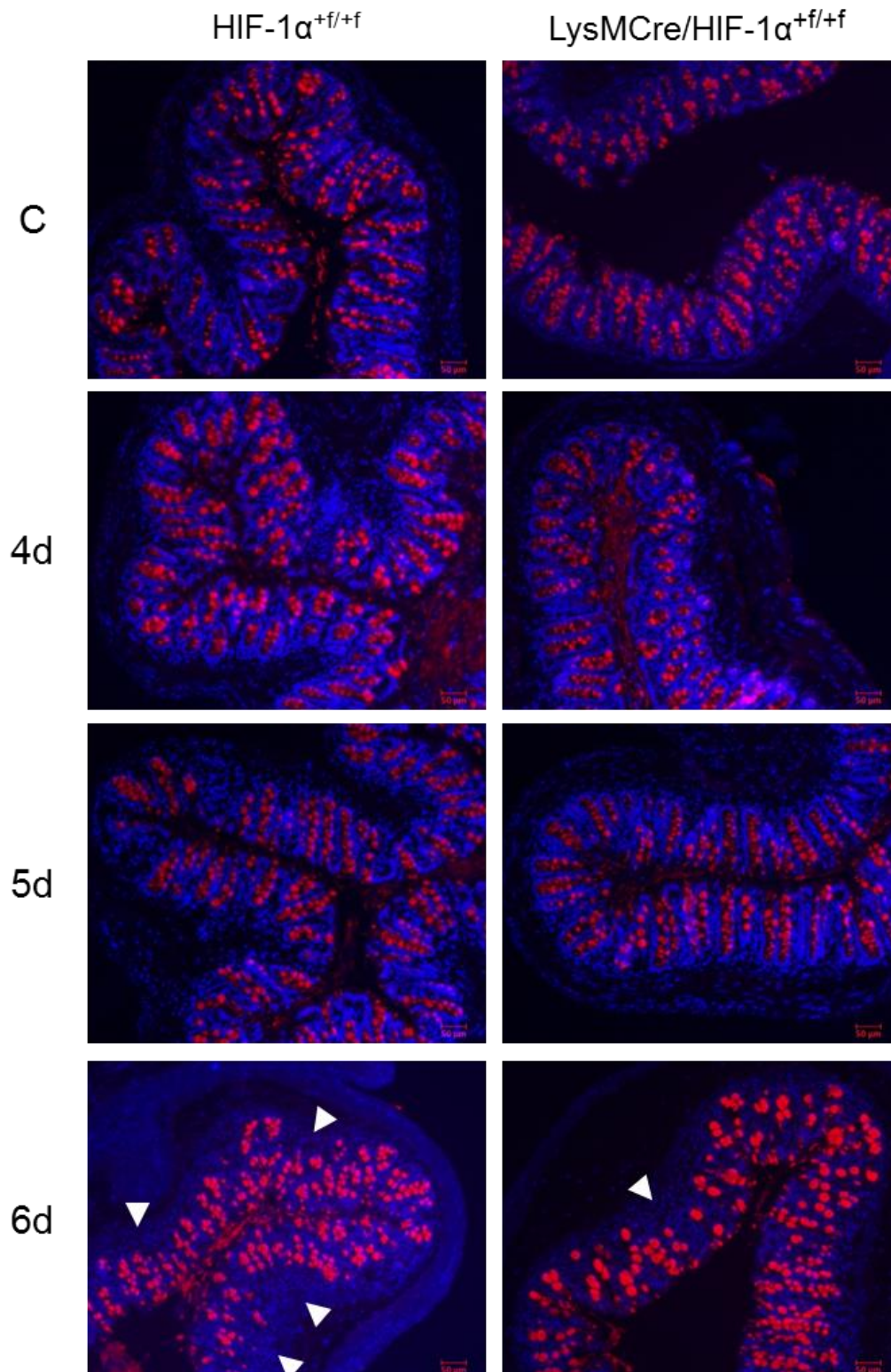


Abbildung 4.13 Mucosale Protektion während DSS-induzierter Colitis: Die Visualisierung von MUCIN-2 erfolgte immunhistochemisch mit Gewebeschnitten des Colons. Dargestellt sind repräsentative Bilder von HIF-1α^{+/+}- und LysMCre/HIF-1α^{+/+}-Tieren aus der Kontrollgruppe (C), sowie der für 4, 5 und 6 Tage DSS-behandelten Tiere (4d, 5d, 6d). Neben der MUCIN-2-Färbung (rot) erfolgte eine Kernfärbung mit dapi (blau). Bereiche mit starker Gewebeschädigung sind durch Pfeile markiert. C: n=5. DSS: n=6. (Vergrößerung: 10x. Maßstabsbalken = 50 μm).

Neben der Visualisierung von MUCIN-2 durch immunhistochemische Färbung, konnten sämtliche Mucopolysaccharide und essigsauren Mucine mit Hilfe der Alcianblau-Färbung dargestellt werden (siehe Abbildung 4.14).

Hier war bei den Tieren der Kontrollgruppe ein regelmäßiges Auftreten von Alcianblau-gefärbten Strukturen festzustellen. Die Alcianblau-gefärbten Bereiche bildeten dabei kleine, runde Strukturen, welche mit den Becherzellen übereinstimmten, meist nah beieinander lagen und im unteren Drittel der *Tunica mucosa* verteilt waren (siehe Abbildung 4.14, C). Zwischen HIF-1 $\alpha^{+/+}$ - und LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren waren dabei keine Unterschiede festzustellen.

Ein ähnliches Bild erhielt man bei den für 4 Tage DSS-behandelten Tieren. Hier waren ebenfalls runde, nah beieinander liegende Alcianblau-gefärbte Strukturen festzustellen, welche jedoch in der gesamten *Tunica mucosa* verteilt waren. Die Färbung erschien dabei stärker als bei den Kontrolltieren (siehe Abbildung 4.14).

Bei den für 5 Tage DSS-behandelten Tieren waren weniger und oft vereinzelte Alcianblau-gefärbte Strukturen im Colon-Gewebeschnitt detektierbar. Bei den HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren schienen diese jedoch noch häufiger zu finden zu sein als bei den LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren (siehe Abbildung 4.14, 5d).

Nach 6 Tagen DSS-Behandlung waren bei den HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren nur noch vereinzelt und nur schwach Alcianblau-gefärbte Strukturen zu erkennen. Bei den LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren erschienen wieder mehr Alcianblau-gefärbte Strukturen als bei den 5 Tage DSS-behandelten LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren. Diese deutlich Alcianblau-gefärbten Strukturen waren wie bei den Kontrolltieren klein, rund und meist nah beieinander im unteren Drittel der *Tunica mucosa* angeordnet (siehe Abbildung 4.14, 6d).

Insgesamt ergab sich für die Alcianblau-gefärbten Colon-Gewebeschnitte der für 6 Tage DSS-behandelten LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere ein ähnliches Bild wie bei den LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere der Kontrollgruppe. Die Colon-Gewebeschnitte der für 6 Tage DSS-behandelten HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere wiesen dagegen eine sehr starke Colon-Gewebeschädigung auf, die mit einer reduzierten Alcianblau-Färbung einherging (siehe Übersichtsbilder Abbildung 4.14).

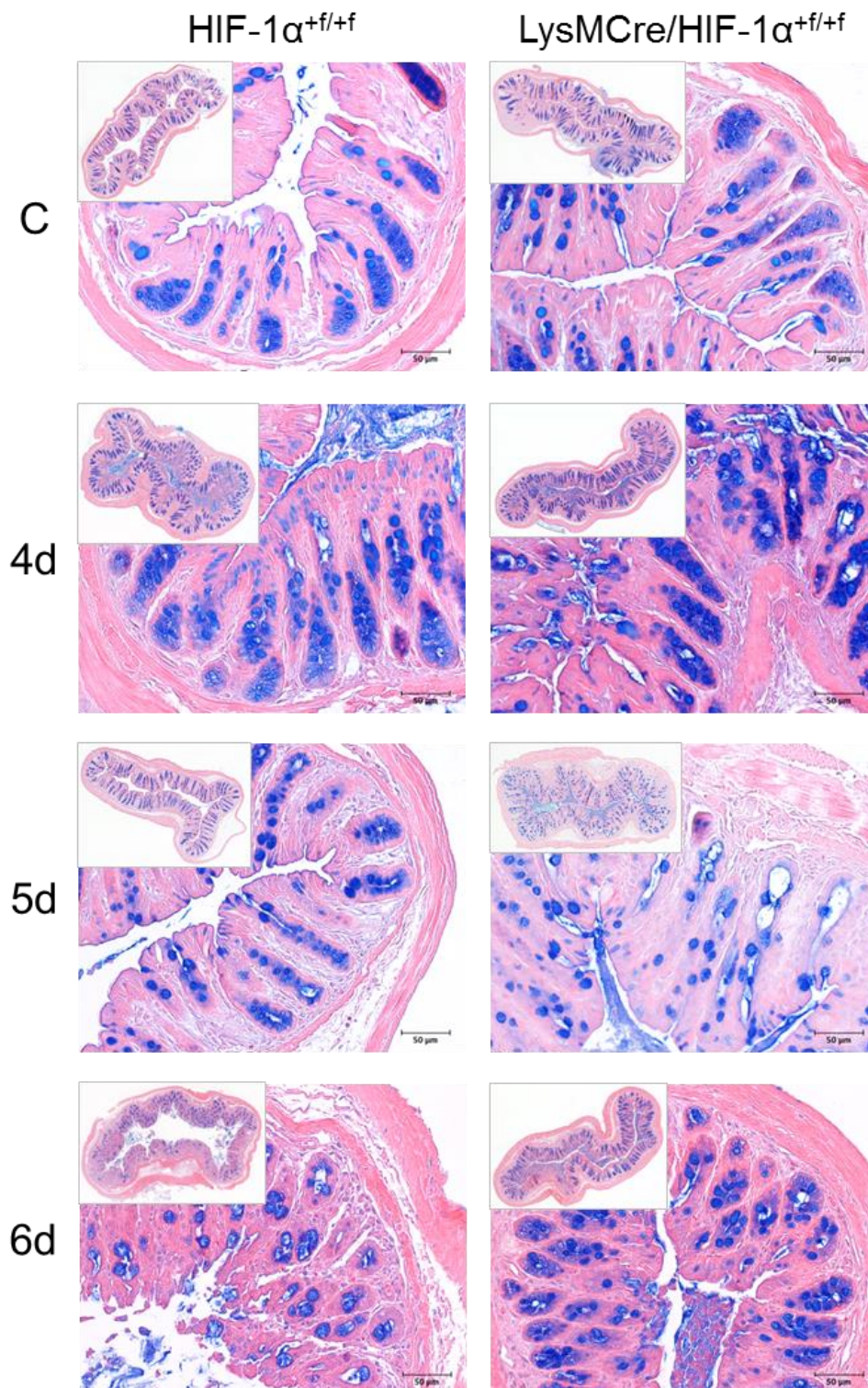


Abbildung 4.14 Mucopolysaccharide und essigsaure Mucine im Colon während DSS-induzierter Colitis: Die Visualisierung von sämtlichen Mucopolysacchariden und essigsaure Mucinen erfolgte histochemisch mit Gewebeschnitten des Colons mit Hilfe der Alcianblau-Färbung. Dargestellt sind repräsentative Bilder von HIF-1 $\alpha^{+/+}$ - und LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren aus der Kontrollgruppe (C), sowie der für 4, 5 und 6 Tage DSS-behandelten Tiere (4d, 5d, 6d). Neben der Alcianblau-Färbung (blau) erfolgte eine Gegenfärbung mit Eosin (rot). Nach 6 Tagen DSS-Behandlung war bei den HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren eine deutliche Verminderung der Alcianblau-Färbung zu beobachten. C: n=5. DSS: n=6. (Vergrößerung Übersichtsbild: 10x. Vergrößerung Detailbild: 20x. Maßstabsbalken = 50 μ m).

4.4.2 Immunzellen im Colon während DSS-induzierter Colitis

Zum quantitativen Nachweis von Makrophagen im Colon wurde der Makrophagen-spezifische Marker *F4/80* mittels qPCR in RNA-Proben nachgewiesen.

Hier zeigte sich ausschließlich in Proben der $\text{HIF-1}\alpha^{+/+}$ -Tiere und erst nach 6 Tagen DSS-Behandlung eine signifikante Erhöhung der *f4/80* Expression im Vergleich zu den Kontrolltieren und den DSS-behandelten $\text{LysMCre/HIF-1}\alpha^{+/+}$ -Tieren. Die Proben der $\text{LysMCre/HIF-1}\alpha^{+/+}$ -Tiere zeigten zu keiner Zeit eine Erhöhung der *f4/80* Expression, sondern sogar eine leichte Verminderung der *f4/80* Expression im Vergleich zu den Kontrolltieren, welche nach 5 Tagen DSS-Behandlung signifikant war (siehe Abbildung 4.15).

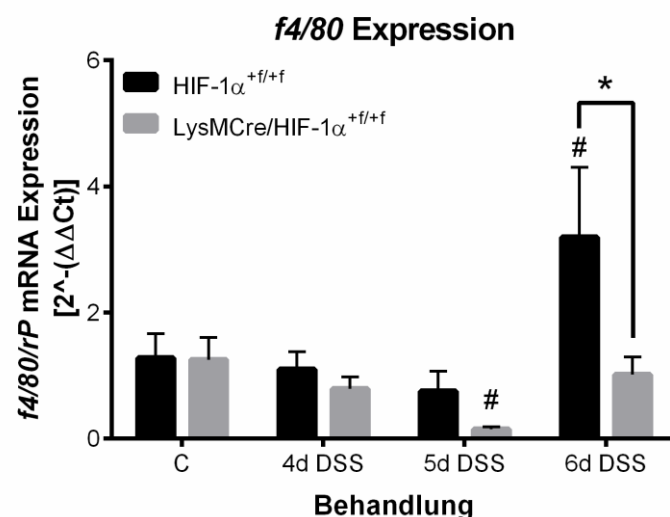


Abbildung 4.15 Makrophagen während DSS-induzierter Colitis: Das Vorkommen von Makrophagen im Colongewebe von $\text{HIF-1}\alpha^{+/+}$ - und $\text{LysMCre/HIF-1}\alpha^{+/+}$ -Tieren wurde mittels qPCR mit Primern für den Makrophagen-spezifischen Marker *f4/80* quantitativ erfasst. Dargestellt sind die Kontrollgruppen (C) und die für 4, 5 und 6 Tage DSS-behandelten Gruppen (4d, 5d, 6d DSS). Nach 6 Tagen DSS-Behandlung war die *f4/80* Expression in Proben der $\text{HIF-1}\alpha^{+/+}$ -Tieren signifikant erhöht im Vergleich zu Proben der $\text{LysMCre/HIF-1}\alpha^{+/+}$ - und Kontrolltiere. C: n=5. DSS: n=6.

Zur genaueren Charakterisierung der Makrophagen wurden die beiden Marker iNOS und ARG-1 mittels qPCR in RNA-Proben nachgewiesen. Diese Marker können zur Unterscheidung von klassisch und alternativ aktivierten Makrophagen verwendet werden (Hesse et al., 2001).

Die Expression von *inos* war nach 4 Tagen DSS-Behandlung sowohl in Proben der $\text{HIF-1}\alpha^{+/+}$ - als auch in Proben der $\text{LysMCre/HIF-1}\alpha^{+/+}$ -Tiere ca. 5-fach erhöht, was signifikant im Vergleich zu den Kontrolltieren war. Nach 5 Tagen DSS-Behandlung erhöhte sich die *inos* Expression in Proben der $\text{LysMCre/HIF-1}\alpha^{+/+}$ -

Tiere auf das ca. 7-fache. In den Proben der HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere kam es jedoch zu einer massiven Erhöhung der *inos* Expression auf das ca. 50-fache, was ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den Proben der Kontrolltiere und der LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere war. Nach 6 Tagen DSS-Behandlung war die *inos* Expression in Proben beider DSS-behandelten Gruppen ca. 20-fach erhöht (siehe Abbildung 4.16 A).

Die Expression von *arg-1* nahm während der ersten 5 Tage DSS-Behandlung in Proben der HIF-1 $\alpha^{+/+}$ - und LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere leicht ab, in Proben der für 5 Tage DSS-behandelten LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere war die Abnahme der *arg-1* Expression sogar signifikant im Vergleich zu den Kontrolltieren. Nach 6 Tagen DSS-Behandlung kam es in beiden DSS-behandelten Gruppen zu einer ca. 4-fachen Erhöhung der *arg-1* Expression, welche signifikant im Vergleich zu den Kontrollgruppen war (siehe Abbildung 4.16 B).

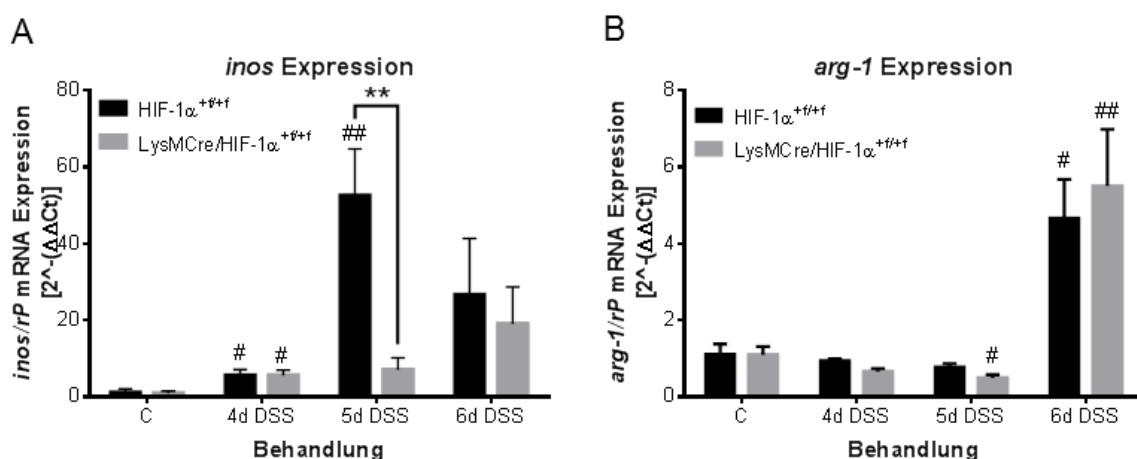


Abbildung 4.16 Die Expression der Marker iNOS und ARG-1 zur Charakterisierung von Makrophagen während DSS-induzierter Colitis: Das Vorkommen der Marker iNOS und ARG-1 zur Differenzierung von klassisch und alternativ aktivierten Makrophagen wurde mittels qPCR und Primern für *inos* (A) und *arg-1* (B) im Colongewebe von HIF-1 $\alpha^{+/+}$ - und LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren quantitativ erfasst. Dargestellt sind die Kontrollgruppen (C) und die für 4, 5 und 6 Tage DSS-behandelten Gruppen (4d, 5d, 6d DSS). Nach 5 Tagen DSS-Behandlung war die *inos* Expression in Proben der HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere signifikant erhöht im Vergleich zu Proben der LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ - und Kontrolltiere (A). Die *arg-1* Expression zeigte erst nach 6 Tagen DSS-Behandlung eine Erhöhung in beiden DSS-behandelten Gruppen (B). C: n=5. DSS: n=6.

Neben dem Nachweis von *f4/80* mittels qPCR konnte F4/80 mit Hilfe eines Antikörpers auch immunhistochemisch auf Colon-Gewebeschnitten visualisiert werden.

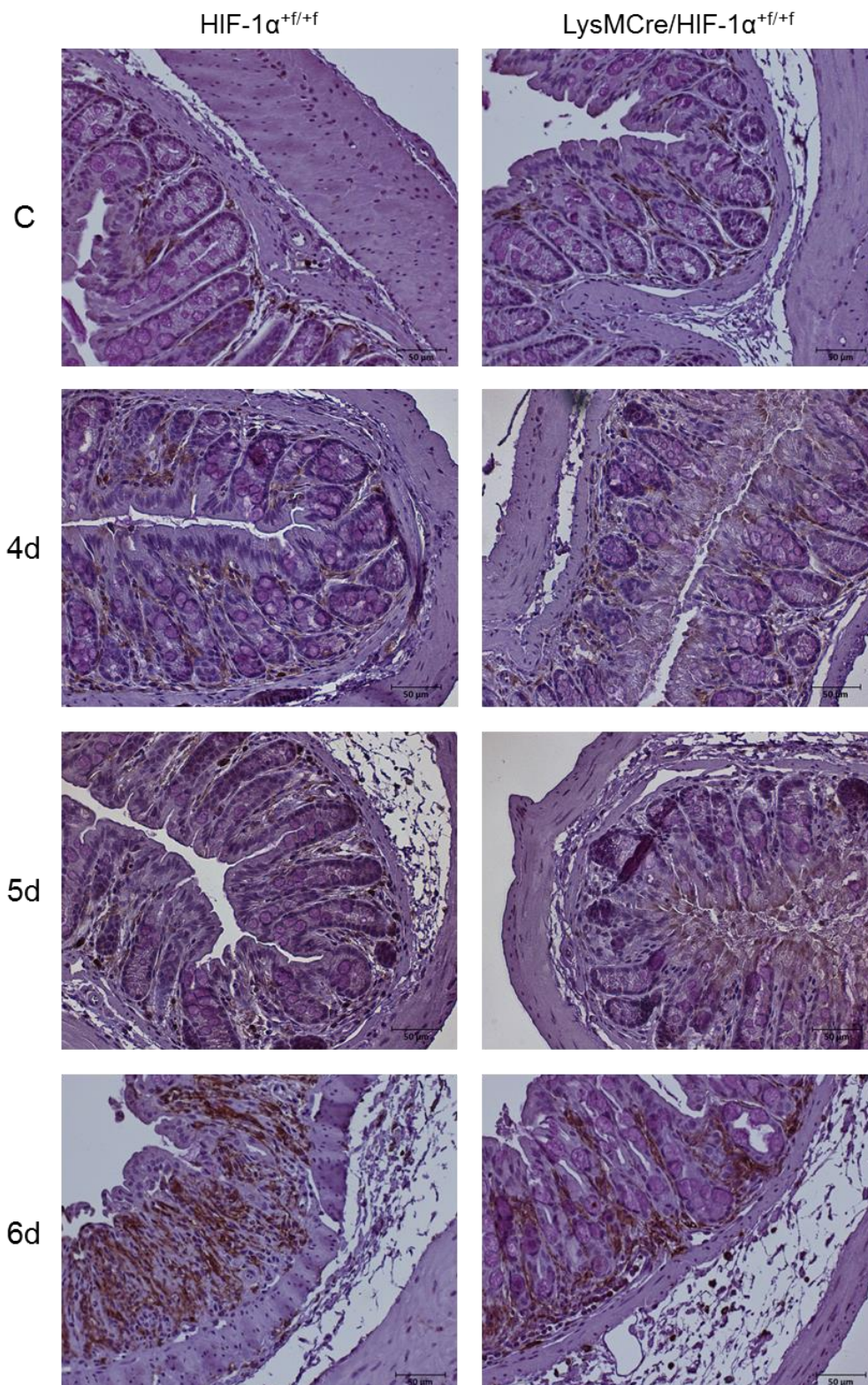


Abbildung 4.17 Das Vorkommen von Makrophagen während DSS-induzierter Colitis: Die Visualisierung von Makrophagen erfolgte immunhistochemisch mit Gewebeschnitten des Colons. Dargestellt sind repräsentative Bilder von HIF-1 $\alpha^{+/+}$ - und LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren aus der Kontrollgruppe (C), sowie der für 4, 5 und 6 Tage DSS-behandelten Tiere (4d, 5d, 6d). Neben der F4/80-Färbung (braun) erfolgte eine Gegenfärbung des Gewebes mit Hämatoxylin (blau). Mit zunehmender DSS-Behandlung war eine deutliche Zunahme der F4/80-Färbung zu beobachten. C: n=5. DSS: n=6. (Vergrößerung: 20x. Maßstabsbalken = 50 μ m).

In Colon-Gewebeschnitten von HIF-1 $\alpha^{+/+}$ - und LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren der Kontrollgruppen waren wenige F4/80-positive Zellen in der *Lamina propria mucosae* und vereinzelt auch in der *Tela submucosa* zu finden (siehe Abbildung 4.17, C). Nach 4 Tagen DSS-Behandlung erhöhte sich die Anzahl der F4/80-positiven Zellen leicht, die Lokalisierung blieb jedoch unverändert (siehe Abbildung 4.17, 4d). In den Colon-Gewebeschnitten der für 5 Tage DSS-behandelten HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere war die Anzahl der in der *Tela submucosa* lokalisierten F4/80-positiven Zellen leicht erhöht. Die LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere zeigten keine Veränderung im Vergleich zu den für 4 Tage DSS-behandelten Tieren (siehe Abbildung 4.17, 5d). Nach 6 Tagen DSS-Behandlung waren deutlich vermehrt F4/80-positive Zellen in der *Lamina propria mucosae* und *Tela submucosa* lokalisiert, wobei die Anzahl der F4/80-positiven Zellen in den HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren eindeutig größer war als in den LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren (siehe Abbildung 4.17, 6d).

Zum quantitativen Nachweis einer weiteren Gruppe myeloischer Zellen im Colon wurde der Neutrophilen-spezifische Marker LY6G (Daley et al., 2008) mittels qPCR in RNA-Proben nachgewiesen.

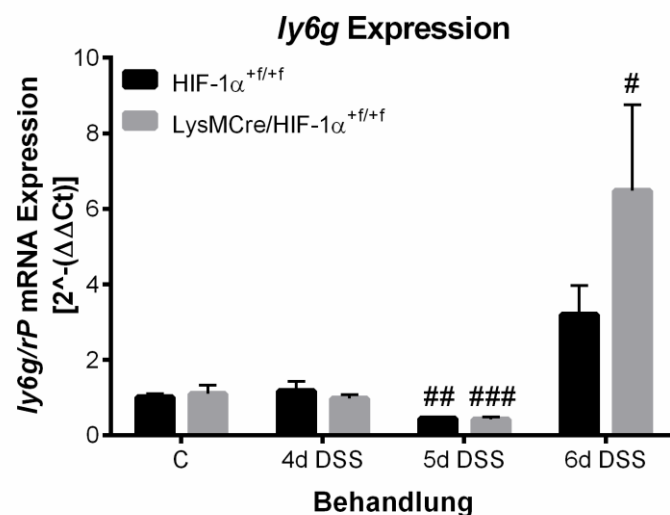


Abbildung 4.18 Neutrophile während DSS-induzierter Colitis: Das Vorkommen von Neutrophilen im Colongewebe von HIF-1 $\alpha^{+/+}$ - und LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren wurde mittels qPCR mit Primern für den Neutrophilen-spezifischen Marker *Iy6g* quantitativ erfasst. Dargestellt sind die Kontrollgruppen (C) und die für 4, 5 und 6 Tage DSS-behandelten Gruppen (4d, 5d, 6d DSS). Nach 6 Tagen DSS-Behandlung war eine signifikante Erhöhung der *Iy6g* Expression in Proben der LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere zu beobachten. C: n=5. DSS: n=6.

ly6g zeigte wie zuvor *f4/80* erst eine signifikante Verminderung der Expression nach 5 Tagen DSS-Behandlung und anschließend eine starke Erhöhung der Expression. Dabei war nach 6 Tagen DSS-Behandlung die *ly6g* Expression in Proben der HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere um ca. das 3-fache und in Proben der LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere signifikant um ca. das 6-fache erhöht, jeweils verglichen mit den Kontrolltieren (siehe Abbildung 4.18).

Zur weiteren Charakterisierung der Neutrophilen wurde der Neutrophilen-spezifische Marker CD177 verwendet, welcher auf 20-80 % der Neutrophilen zu finden ist (Matsuo et al., 2000) und an der Infiltration und Migration von Neutrophilen beteiligt ist (Xie et al., 2015).

CD177 zeigte ebenfalls wie F4/80 und LY6G in den ersten Tagen der DSS-Behandlung eine leichte Reduzierung der Expression und erst nach 6 Tagen DSS-Behandlung eine Erhöhung. Die *cd177* Expression war an Tag 6 bei Proben der DSS-behandelten HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere ca. 1,5-fach erhöht, was einen signifikanten Unterschied zu den Proben der DSS-behandelten LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere darstellte (siehe Abbildung 4.19).

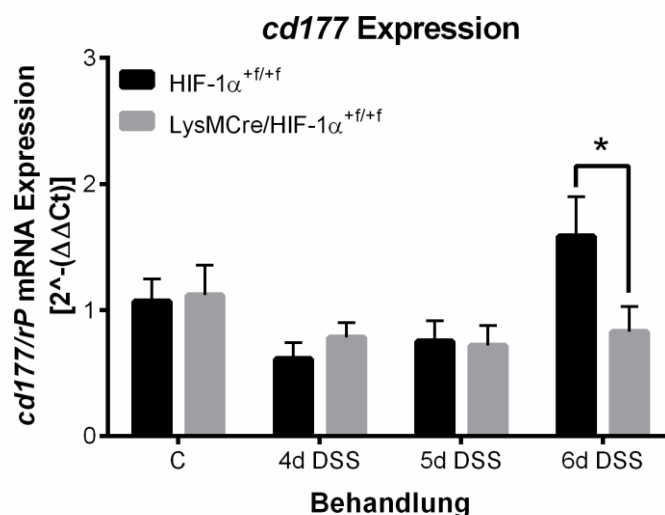


Abbildung 4.19 Die Expression des Markers CD177 zur Charakterisierung von Neutrophilen während DSS-induzierter Colitis: Das Vorkommen des Neutrophilen-spezifischen Markers CD177 wurde mittels qPCR im Colongewebe von HIF-1 $\alpha^{+/+}$ - und LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren mit Primern für *cd177* quantitativ erfasst. Dargestellt sind die Kontrollgruppen (C) und die für 4, 5 und 6 Tage DSS-behandelten Gruppen (4d, 5d, 6d DSS). Nach 6 Tagen DSS-Behandlung war eine signifikante Erhöhung der *cd177* Expression in Proben der HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere zu beobachten. C: n=5. DSS: n=6.

Dendritische Zellen, eine weitere Gruppe myeloischer Zellen, wurde mit Hilfe des Markers CD11C in RNA aus Colongewebe mittels qPCR quantitativ erfasst.

Die *cd11c* Expression war bereits unter Kontrollbedingungen in Proben der LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere um die Hälfte reduziert im Vergleich zu den HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren. Nach DSS-Behandlung erhöhte sich nur in Proben der HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere die *cd11c* Expression und war zu allen Zeitpunkten signifikant erhöht im Vergleich zu den Proben der LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ - und Kontrolltiere. Auch wenn diese nach 6 Tagen DSS-Behandlung leicht abnahm (siehe Abbildung 4.20).

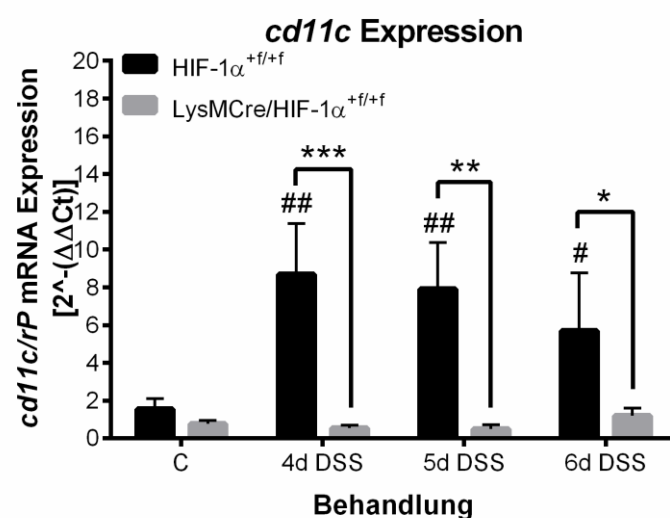


Abbildung 4.20 Dendritische Zellen während DSS-induzierter Colitis: Das Vorkommen von dendritischen Zellen im Colongewebe von HIF-1 $\alpha^{+/+}$ - und LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren wurde mittels qPCR mit Primern für den dendritischen Zell-Marker *cd11c* quantitativ erfasst. Dargestellt sind die Kontrollgruppen (C) und die für 4, 5 und 6 Tage DSS-behandelten Gruppen (4d, 5d, 6d DSS). An allen Tagen der DSS-Behandlung war eine signifikante Erhöhung der *cd11c* Expression in Proben der HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere zu beobachten. C: n=5. DSS: n=6.

Auch das Vorkommen von Immunzellen des adaptiven Immunsystems wurde mit Hilfe von qPCR in RNA aus Colongewebe quantitativ erfasst. Dazu wurde CD4 als Marker für T-Helferzellen und regulatorische T-Zellen und CD8a als Marker für zytotoxische T-Zellen gewählt (Murphy et al., 2009).

Die *cd4* Expression war an allen Tagen der DSS-Behandlung in Proben der HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere signifikant im Vergleich zu den Kontrolltieren und an Tag 4 und 5 der DSS-Behandlung signifikant im Vergleich zu den DSS-behandelten LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren erhöht. Die Proben der LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere zeigten zu keiner Zeit der DSS-Behandlung eine Erhöhung der *cd4* Expression, sondern an Tag 4 und 5 der DSS-Behandlung eine Reduktion der *cd4* Expression um ca. die Hälfte (siehe Abbildung 4.21 A).

Die *cd8a* Expression zeigte zu keiner Zeit der DSS-Behandlung Unterschiede zwischen den Proben der HIF-1 $\alpha^{+/+}$ - und LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere. Nach 6 Tagen DSS-Behandlung war in Proben beider DSS-behandelten Gruppen eine Erhöhung der *cd8a* Expression um das ca. 2-3-fache zu beobachten (siehe Abbildung 4.21 B).

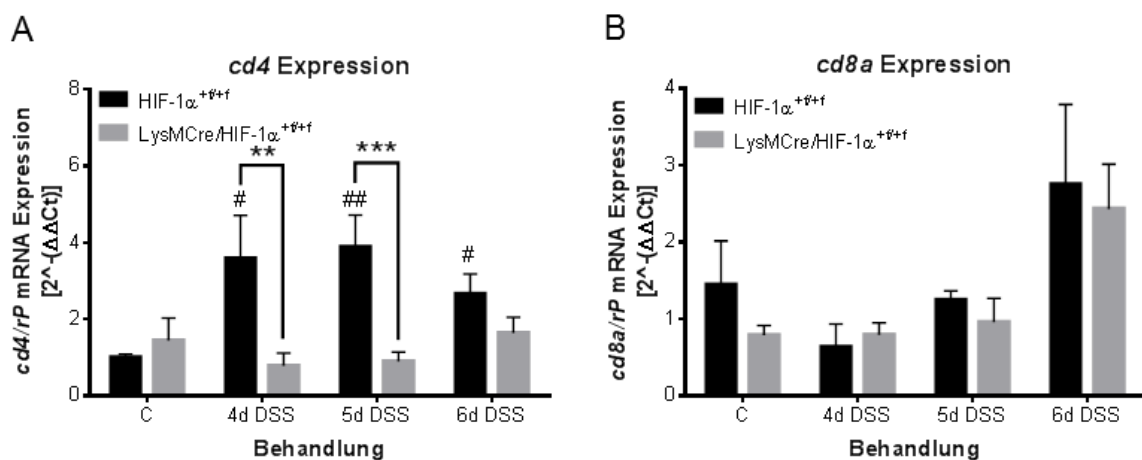


Abbildung 4.21 T-Zellen während DSS-induzierter Colitis: Das Vorkommen von T-Zellen im Colongewebe von HIF-1 $\alpha^{+/+}$ - und LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren wurde mittels qPCR mit Primern für die T-Zell-spezifischen Marker *cd4* und *cd8* quantitativ erfasst. Dargestellt sind die Kontrollgruppen (C) und die für 4, 5 und 6 Tage DSS-behandelten Gruppen (4d, 5d, 6d DSS). An allen Tagen der DSS-Behandlung war eine signifikante Erhöhung der *cd4* Expression in Proben der HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere zu beobachten. Die *cd8a* Expression war erst an Tag 6 der DSS-Behandlung erhöht und zeigte zu keiner Zeit Unterschiede zwischen HIF-1 $\alpha^{+/+}$ - und LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren. C: n=5. DSS: n=6.

Eine Untergruppe der CD4⁺ T-Helferzellen, Th17, wurde ebenfalls in RNA aus Colongewebe mittels qPCR quantitativ erfasst. Das Th17-spezifische Zytokin IL-17A wurde dabei als Marker gewählt.

Die *il-17a* Expression war zu allen Zeitpunkten der DSS-Behandlung in den HIF-1 α ^{+f/+f}-Tieren signifikant erhöht im Vergleich zu den LysMCre/HIF-1 α ^{+f/+f}- und Kontrolltieren. Dabei war nach 4 Tagen eine ca. 3,5-fache, nach 5 Tagen eine ca. 5-fache und nach 6 Tagen DSS-Behandlung eine ca. 35-fache Erhöhung der *il-17a* Expression zu beobachten. Die Proben der LysMCre/HIF-1 α ^{+f/+f}-Tiere zeigten erst nach 6 Tagen DSS-Behandlung eine ca. 3,5-fache Erhöhung der *il-17a* Expression (siehe Abbildung 4.22).

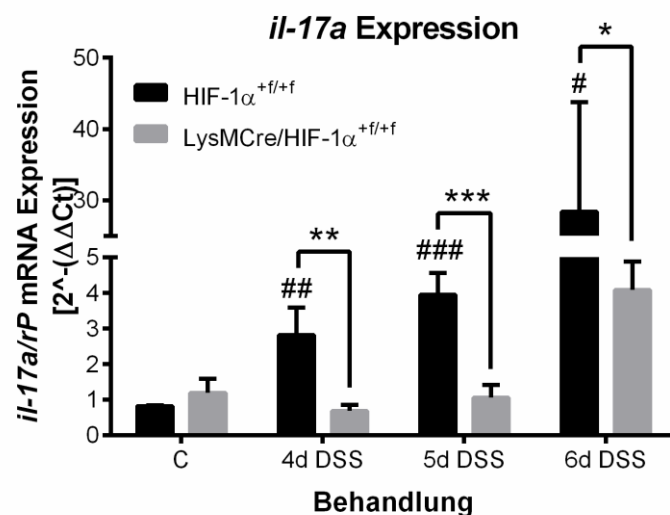


Abbildung 4.22 Die Expression des Th17-spezifischen Zytokins IL-17A während DSS-induzierter Colitis: Das Vorkommen von Th17 im Colongewebe von HIF-1 α ^{+f/+f}- und LysMCre/HIF-1 α ^{+f/+f}-Tieren wurde mittels qPCR mit Primern für das Th17-spezifische Zytokin *il-17a* quantitativ erfasst. Dargestellt sind die Kontrollgruppen (C) und die für 4, 5 und 6 Tage DSS-behandelten Gruppen (4d, 5d, 6d DSS). Zu allen Zeitpunkten der DSS-Behandlung war die *il-17a* Expression in den DSS-behandelten HIF-1 α ^{+f/+f}-Tieren erhöht. C: n=5. DSS: n=6.

Eine weitere Untergruppe der CD4⁺ T-Zellen, T_{reg}, wurde mit dem T_{reg}-spezifischen Marker FOXP3 quantitativ mittels qPCR in RNA aus Colongewebe nachgewiesen.

Wie bei F4/80 und LY6G war auch bei FOXP3 erst nach 6 Tagen DSS-Behandlung eine Erhöhung der *foxp3* Expression zu vermerken. Hier zeigten die Proben der DSS-behandelten HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere eine ca. 5-fache Erhöhung der *foxp3* Expression im Vergleich zu den Tieren der Kontrollgruppe. Die Proben der DSS-behandelten LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere zeigten eine, im Vergleich zu den DSS-behandelten HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren, mehr als doppelt so hohe Steigerung der *foxp3* Expression (11-fach) (siehe Abbildung 4.23).

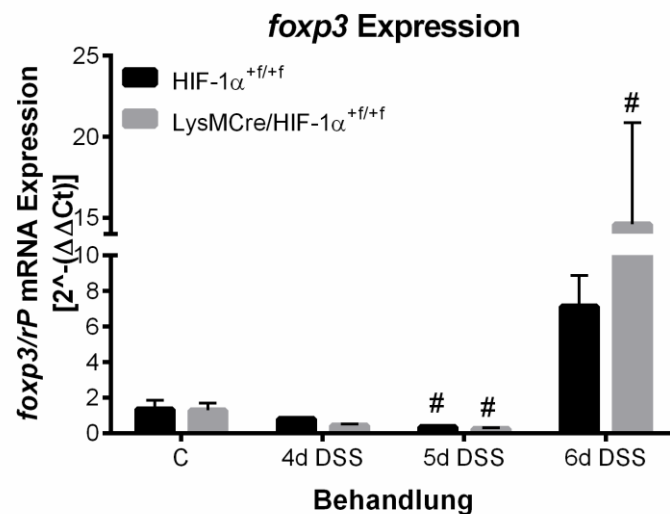


Abbildung 4.23 T_{reg} während DSS-induzierter Colitis: Das Vorkommen von T_{reg} im Colongewebe von HIF-1 $\alpha^{+/+}$ - und LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren wurde mittels qPCR mit Primern für den T_{reg}-spezifischen Marker *foxp3* quantitativ erfasst. Dargestellt sind die Kontrollgruppen (C) und die für 4, 5 und 6 Tage DSS-behandelten Gruppen (4d, 5d, 6d DSS). Nach 6 Tagen DSS-Behandlung war die *foxp3* Expression in beiden DSS-behandelten Gruppen erhöht. C: n=5. DSS: n=6.

Neben der Expression von *foxp3* konnte das Protein FOXP3 immunhistochemisch nachgewiesen werden. Gewebeschnitte des Colons wurden dafür mit einem Antikörper gegen FOXP3 gefärbt und mikroskopisch aufgenommen.

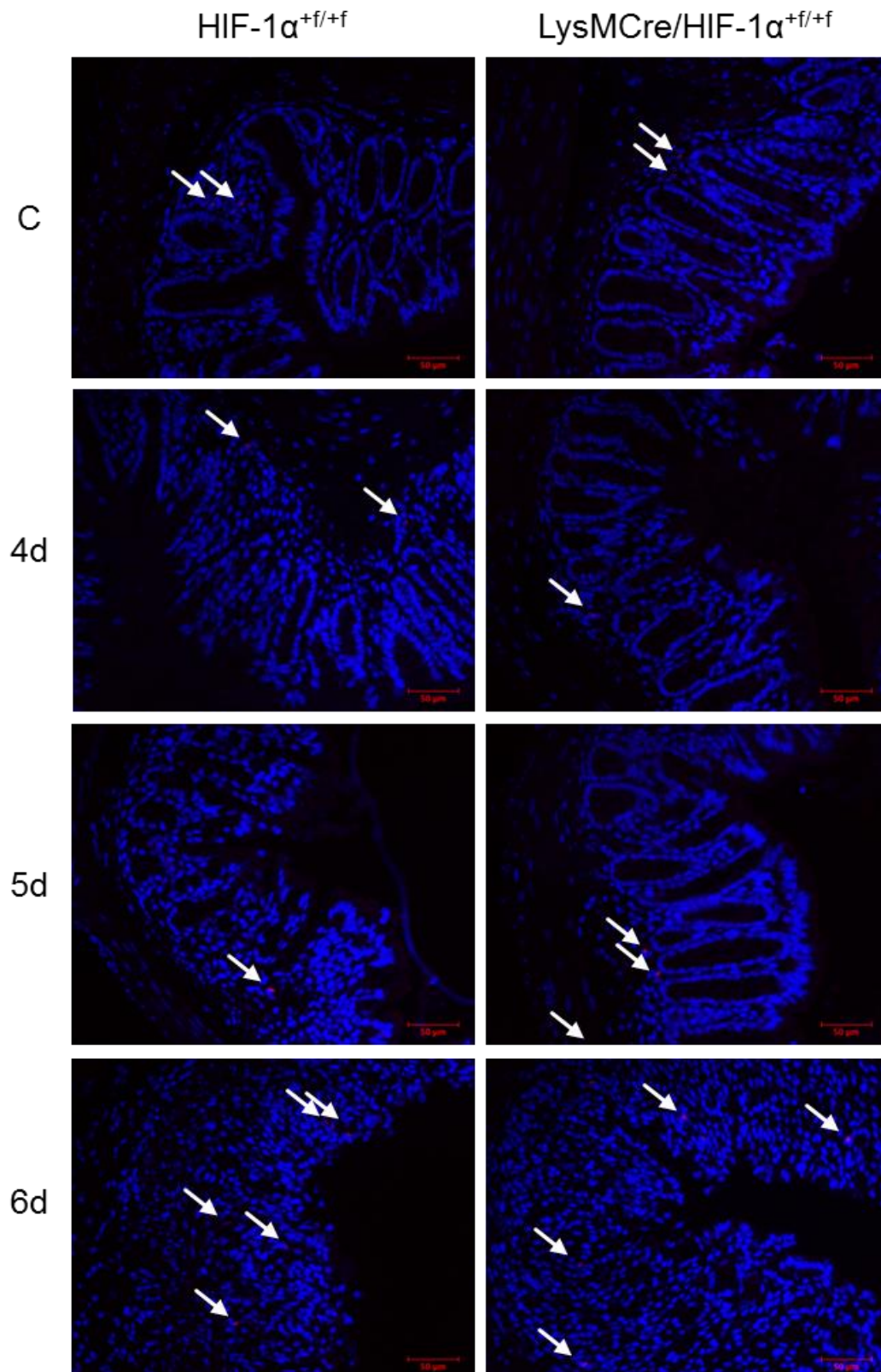


Abbildung 4.24 Das Vorkommen von T_{reg} während DSS-induzierter Colitis: Die Visualisierung von FOXP3 erfolgte immunhistochemisch mit Gewebeschnitten des Colons. Dargestellt sind repräsentative Bilder von $\text{HIF-1}\alpha^{+/+}$ - und $\text{LysMCre/HIF-1}\alpha^{+/+}$ -Tieren aus der Kontrollgruppe (C), sowie der für 4, 5 und 6 Tage DSS-behandelten Tiere (4d, 5d, 6d). Neben der FOXP3-Färbung (rot, Pfeile) erfolgte eine Kernfärbung mit dapi (blau). Nach 6 Tagen DSS-Behandlung waren vermehrt FOXP3 positive Zellen zu identifizieren. C: n=5. DSS: n=6. (Vergrößerung: 10x. Maßstabsbalken = 50 μm).

Bei den Tieren der Kontrollgruppe waren nur vereinzelt FOXP3 positive Zellen festzustellen. Das Signal für FOXP3 war dabei ausschließlich im unteren Drittel der *Tunica mucosa* vorzufinden (siehe Abbildung 4.24, C). Zwischen HIF-1 $\alpha^{+/+/-}$ - und LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+/-}$ -Tieren waren dabei keine eindeutigen Unterschiede festzustellen.

Ein ähnliches Bild war bei den für 4 und 5 Tage DSS-behandelten Tieren zu sehen. Nach 5 Tagen DSS-Behandlung waren jedoch geringfügig mehr FOXP3 positive Zellen im Colongewebe der LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+/-}$ - als der HIF-1 $\alpha^{+/+/-}$ -Tiere zu identifizieren (siehe Abbildung 4.24, 4d und 5d).

Nach 6 Tagen DSS-Behandlung waren in den Colon-Gewebeschnitten deutlich vermehrt FOXP3 gefärbte Zellen zu erkennen. Diese waren in der gesamten *Tunica mucosa* zu finden (siehe Abbildung 4.24, 6d). Es konnten jedoch keine eindeutigen Unterschiede zwischen HIF-1 $\alpha^{+/+/-}$ - und LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+/-}$ -Tieren festgestellt werden.

Die quantitative Auswertung der Anzahl FOXP3 gefärbter Zellen zeigte ebenfalls erst nach 6 Tagen DSS-Behandlung eine deutliche Zunahme FOXP3 positiver Zellen in beiden Tiergruppen, welche signifikant im Vergleich zu den Tieren der Kontrollgruppe war (siehe Abbildung 4.25).

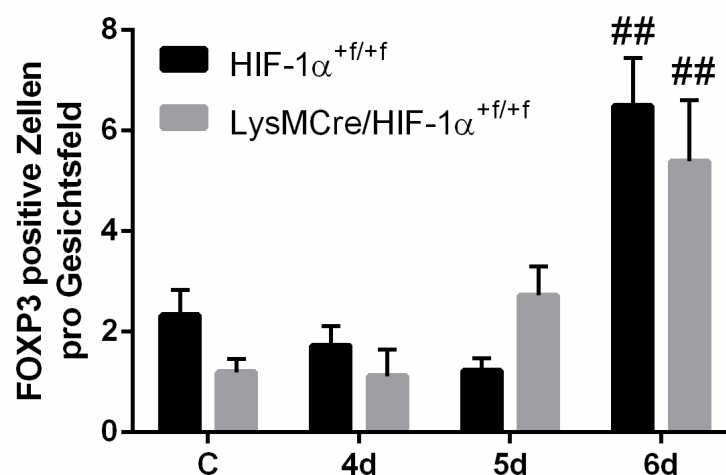


Abbildung 4.25 Auswertung der FOXP3-Färbung: FOXP3-gefärbte Gewebeschnitte des Colons von HIF-1 $\alpha^{+/+/-}$ - und LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+/-}$ -Tieren der Kontrollgruppe (C) und der für 4, 5 und 6 Tage DSS-behandelten Gruppen (4d, 5d, 6d) wurden quantitativ ausgewertet, indem FOXP3 positive Zellen in je drei Gesichtsfeldern ausgezählt wurden. Nach 6 Tagen DSS-Behandlung war eine deutliche Zunahme FOXP3 positiver Zellen in beiden Tiergruppen zu beobachten. C: n=5. DSS: n=6.

4.4.3 Zytokin-Expression im Colon nach DSS-Behandlung

Die Bildung verschiedener Zytokine wurde mittels qPCR in RNA aus Colongewebe quantitativ nachgewiesen. Die Zytokine TNF α und IFN γ spielen in der Erforschung von CED und der Aktivierung von Makrophagen eine besondere Rolle und waren daher von besonderem Interesse.

Die Expression des pro-inflammatorischen Zytokins *tnfa* zeigte zu allen Zeitpunkten der DSS-Behandlung eine signifikante Erhöhung in den Proben der HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere im Vergleich zu den Proben der Kontrolltiere. Nach 4 und 5 Tagen DSS-Behandlung war diese mit einer Erhöhung um das ca. 2,5-fache auch signifikant im Vergleich zu den Proben der LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere. Die Proben der LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere zeigten nach 6 Tagen DSS-Behandlung eine leichte Erhöhung der *tnfa* Expression um das ca. 1,6-fache (siehe Abbildung 4.26 A).

Auch die *ifn γ* Expression war zu allen Zeitpunkten der DSS-Behandlung in Proben der HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere erhöht. An Tag 4 und 5 der DSS-Behandlung war diese mit einer Erhöhung um ca. das 1,7-fache signifikant im Vergleich zu den LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren. Die Proben beider DSS-behandelten Gruppen zeigten nach 6 Tagen eine ca. 12-fache Erhöhung der *ifn γ* Expression (siehe Abbildung 4.26 B).

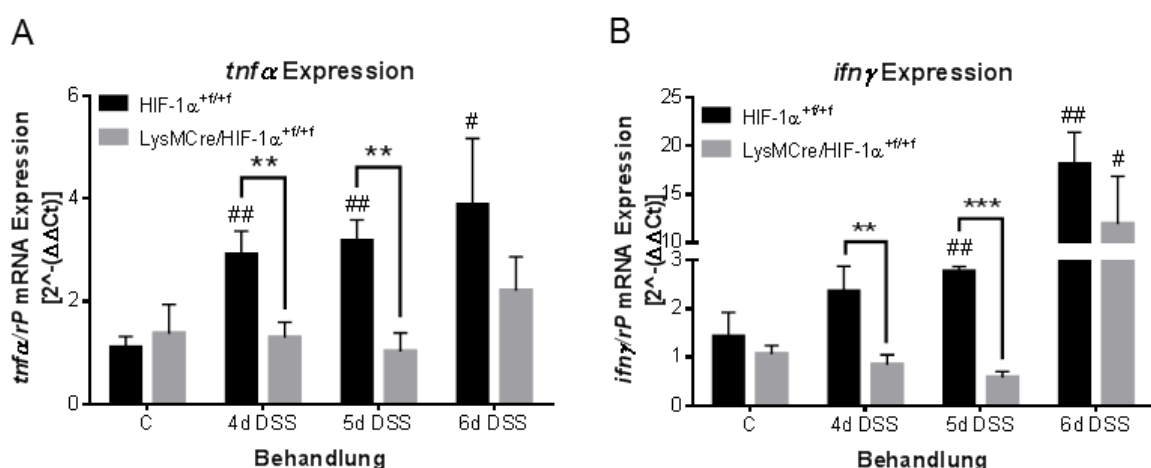


Abbildung 4.26 Die Zytokine TNF α und IFN γ im Verlauf der DSS-induzierten Colitis: Das Vorkommen der CED-assoziierten inflammatorischen Zytokine TNF α und IFN γ im Colongewebe von HIF-1 $\alpha^{+/+}$ - und LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren wurde mittels qPCR mit Primern für *tnfa* und *ifn γ* quantitativ erfasst. Dargestellt sind die Kontrollgruppen (C) und die für 4, 5 und 6 Tage DSS-behandelten Gruppen (4d, 5d, 6d DSS). Zu allen Zeitpunkten der DSS-Behandlung waren die *tnfa* und *ifn γ* Expression in Proben der HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere signifikant erhöht. C: n=5. DSS: n=6.

Ein weiteres CED-assoziiertes pro-inflammatorisches Zytokin stellt IL-6 dar, welches ebenfalls mittels qPCR in RNA aus Colongewebe quantitativ nachgewiesen wurde.

Erst nach 6 Tagen DSS-Behandlung zeigte sich eine Erhöhung der *il-6* Expression. Diese war in Proben der HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere um das 8-fache und in Proben der LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere um das 20-fache erhöht, letzteres war signifikant im Vergleich zu den Proben der Kontrolltiere. Nach 4 und 5 Tagen DSS-Behandlung war eine leichte Reduzierung der *il-6* Expression in den Proben beider DSS-behandelten Gruppen zu beobachten (siehe Abbildung 4.27).

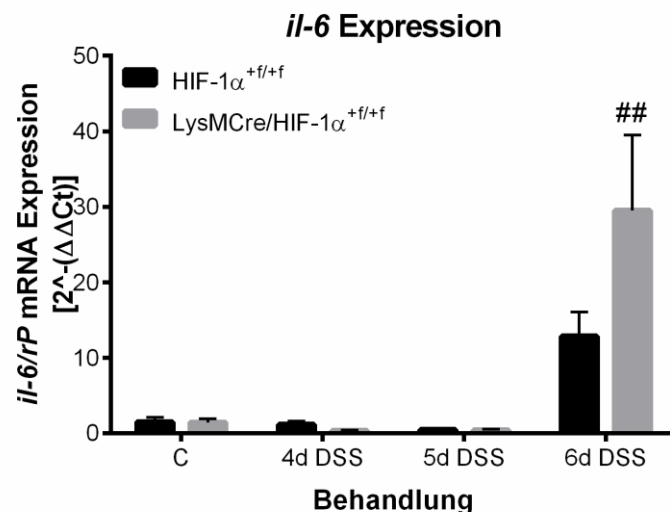


Abbildung 4.27 Das pro-inflammatorische Zytokin IL-6 im Verlauf der DSS-induzierten Colitis: Das Vorkommen des pro-inflammatorischen Zytokins IL-6 im Colongewebe von HIF-1 $\alpha^{+/+}$ - und LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren wurde mittels qPCR mit Primern für *il-6* quantitativ erfasst. Dargestellt sind die Kontrollgruppen (C) und die für 4, 5 und 6 Tage DSS-behandelten Gruppen (4d, 5d, 6d DSS). Nach 6 Tagen DSS-Behandlung ist eine Erhöhung der *il-6* Expression in Proben beider DSS-behandelten Gruppen zu beobachten. C: n=5. DSS: n=6.

Weiterhin wurde ebenfalls ein anti-inflammatorisches Zytokin, IL-10, mittels qPCR in RNA aus Colongewebe nachgewiesen.

Hier zeigten, wie schon bei TNF α und IFN γ , die Proben der HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere zu jedem Zeitpunkt der DSS-Behandlung eine erhöhte *il-10* Expression. Diese war nach 4 und 5 Tagen ca. 2-fach und nach 6 Tagen DSS-Behandlung ca. 4-fach erhöht. Zu allen Zeitpunkten war diese Erhöhung signifikant im Vergleich zu den Proben der Kontrolltiere und an Tag 4 und 5 signifikant im Vergleich zu den Proben der LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere. Bei den Proben der LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere war erst nach 6 Tagen DSS-Behandlung eine ca. 2-fache Erhöhung der *il-10* Expression festzustellen (siehe Abbildung 4.28).

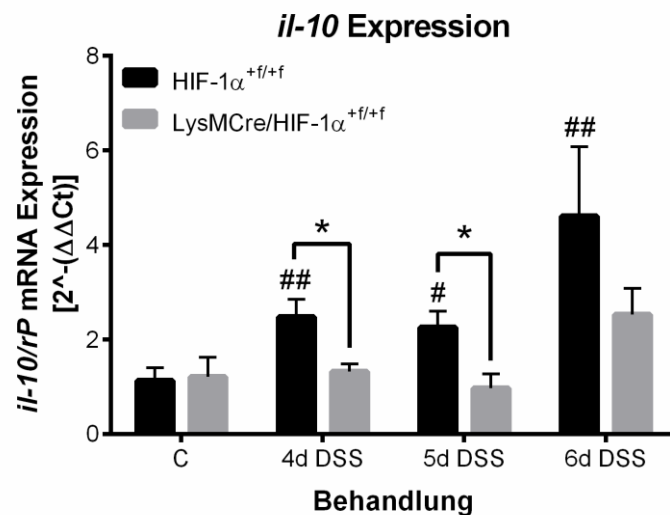


Abbildung 4.28 Das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 im Verlauf der DSS-induzierten Colitis: Das Vorkommen des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 im Colongewebe von HIF-1 $\alpha^{+/+}$ - und LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren wurde mittels qPCR mit Primern für *il-10* quantitativ erfasst. Dargestellt sind die Kontrollgruppen (C) und die für 4, 5 und 6 Tage DSS-behandelten Gruppen (4d, 5d, 6d DSS). Zu allen Zeitpunkten der DSS-Behandlung war in Proben der HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere eine Erhöhung der *il-10* Expression festzustellen. C: n=5. DSS: n=6.

Lipocalin-2, welches hauptsächlich von Neutrophilen exprimiert wird und als Marker für intestinale Entzündungen verwendet werden kann (Chassaing et al., 2012), wurde ebenfalls mittels qPCR in RNA aus Colongewebe nachgewiesen.

Die *lcn-2* Expression war in allen Proben der DSS-behandelten HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere erhöht und zu allen Zeitpunkten war diese Erhöhung signifikant im Vergleich zu Proben der LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere. Nach 4 Tagen war die *lcn-2* Expression ca. 3-fach und nach 6 Tagen ca. 14-fach erhöht, was signifikant war im Vergleich zu Proben der Kontrolltiere. Die Proben der LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere zeigten erst nach 6 Tagen DSS-Behandlung eine ca. 6-fache Erhöhung der *lcn-2* Expression, welche signifikant war im Vergleich zu den Proben der Kontrolltiere (siehe Abbildung 4.29).

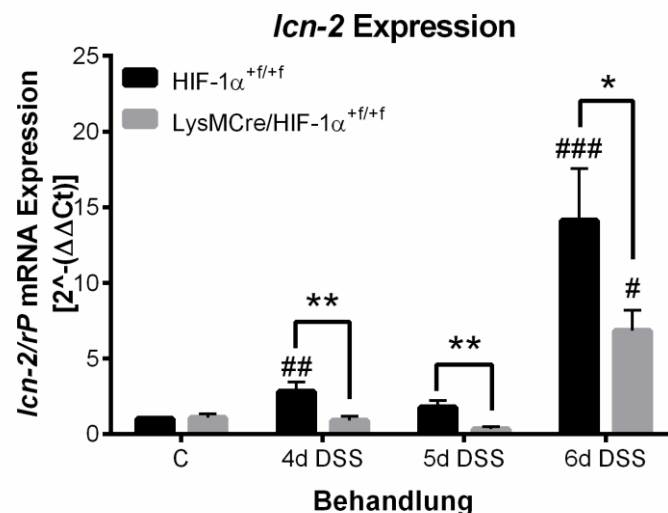


Abbildung 4.29 Lipocalin-2 im Verlauf der DSS-induzierten Colitis: Das Vorkommen von Lipocalin-2 im Colongewebe von HIF-1 $\alpha^{+/+}$ - und LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren wurde mittels qPCR mit Primern für *lcn-2* quantitativ erfasst. Dargestellt sind die Kontrollgruppen (C) und die für 4, 5 und 6 Tage DSS-behandelten Gruppen (4d, 5d, 6d DSS). Zu allen Zeitpunkten der DSS-Behandlung war in Proben der HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere eine Erhöhung der *lcn-2* Expression festzustellen. C: n=5. DSS: n=6.

Ein weiteres CED-assoziiertes Zytokin, TGF β 1, wurde mittels qPCR in RNA aus Colongewebe nachgewiesen.

Nach 4 Tagen DSS-Behandlung war die *tgfb1* Expression in Proben der HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere leicht um das 1,5-fache erhöht. In Proben der LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere ergab sich keine Veränderung. Nach 5 Tagen DSS-Behandlung ließ sich sogar eine Verminderung der *tgfb1* Expression in Proben der LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere beobachten, welche signifikant im Vergleich zu den Proben der HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere war. Nach 6 Tagen DSS-Behandlung war die *tgfb1* Expression in Proben beider DSS-behandelten Gruppen erhöht. Bei Proben der HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere war die *tgfb1* Expression um das ca. 2-fache und bei den Proben der LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere um das ca. 3-fache erhöht gegenüber der jeweiligen Kontrolle (siehe Abbildung 4.30).

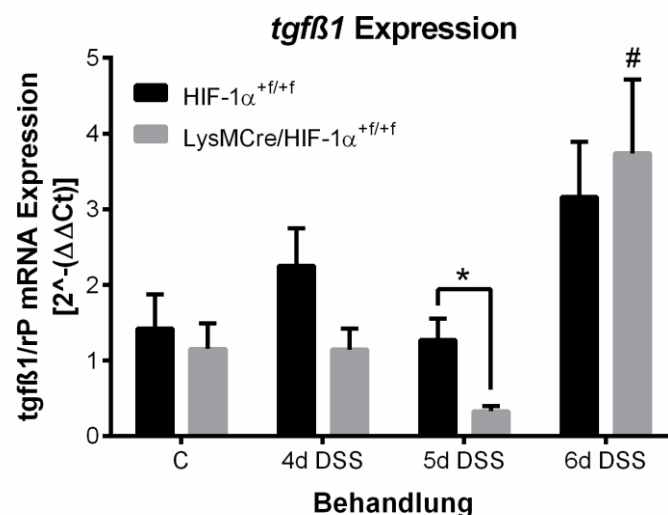


Abbildung 4.30 TGF β 1 im Verlauf der DSS-induzierten Colitis: Das Vorkommen von TGF β 1 im Colongewebe von HIF-1 $\alpha^{+/+}$ - und LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren wurde mittels qPCR mit Primern für *tgfb1* quantitativ erfasst. Dargestellt sind die Kontrollgruppen (C) und die für 4, 5 und 6 Tage DSS-behandelten Gruppen (4d, 5d, 6d DSS). Nach 6 Tagen DSS-Behandlung war in Proben beider DSS-behandelten Gruppen eine Erhöhung der *tgfb1* Expression festzustellen. C: n=5. DSS: n=6.

4.4.4 Immunzellen in mesenterischen Lymphknoten während DSS-induzierter Colitis

Die Aktivierung und Rekrutierung verschiedener Immunzellen gewinnt in der aktuellen Forschung immer mehr an Bedeutung. Eine wichtige Rolle nimmt dabei Retinsäure ein, welche einen Modulator der intestinalen Immunreaktion darstellt und u.a. in Kombination mit TGF β die DC- und Makrophagen-stimulierte Differenzierung von T_{reg} fördert (Denning et al., 2007). Retinsäure entsteht durch die Konvertierung von Vitamin A durch Alkohol-Dehydrogenasen (Aldh) auf der Oberfläche von DC und Makrophagen (Duester, 2000). Dabei exprimieren intestinale DC hauptsächlich die Aldh-Isoform ALDH1A2 und intestinale Makrophagen die Isoform ALDH1A1 (Iwata et al., 2004; Sanders et al., 2014). Daher wurde auch die Verteilung von Makrophagen und DC und das Vorkommen der beiden Aldh-Isoformen ALDH1A1 und ALDH1A2 in RNA aus mesenterischen Lymphknoten mittels qPCR nachgewiesen.

Die Expression von *f4/80* zeigte in Proben der HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere nach 4 Tagen DSS-Behandlung eine Verdopplung im Vergleich zu den Kontrolltieren, was einen signifikanten Unterschied im Vergleich zu den Proben der LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere darstellte. Diese Erhöhung war nach 5 Tagen DSS-Behandlung jedoch nicht mehr zu verzeichnen. Nach 6 Tagen DSS-Behandlung war die *f4/80* Expression in Proben beider DSS-behandelten Gruppen ca. 2-fach erhöht. Es gab jedoch keinen Unterschied zwischen HIF-1 $\alpha^{+/+}$ - und LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren (siehe Abbildung 4.31 A).

Die *cd11c* Expression war zu allen Zeitpunkten der DSS-Behandlung in Proben der HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere ca. 3-4-fach erhöht, was signifikant war im Vergleich zu den Proben der Kontrolltiere und der DSS-behandelten LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere, welche zu keiner Zeit der DSS-Behandlung einer Erhöhung der *cd11c* Expression aufwiesen (siehe Abbildung 4.31 B).

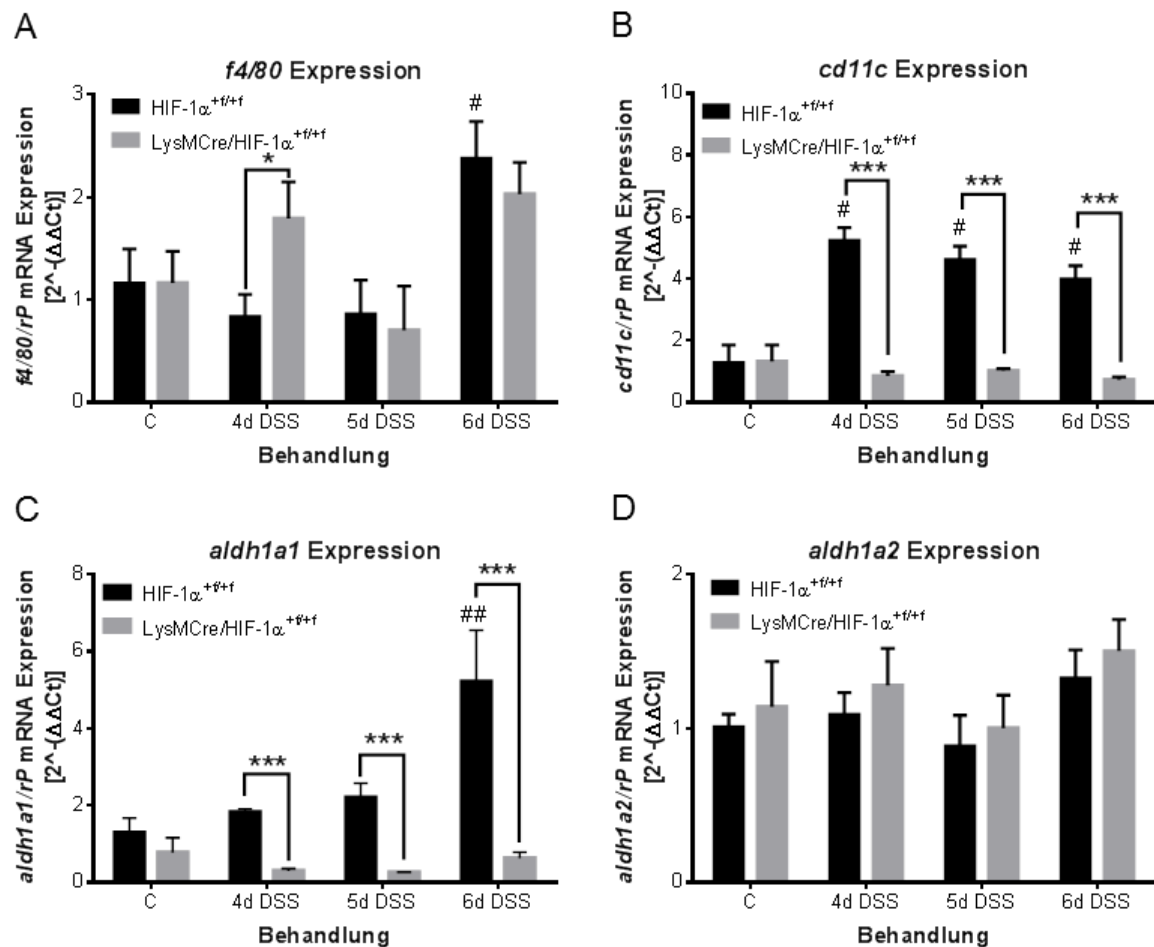


Abbildung 4.31 Immunzellen und Retinsäure in mesenterischen Lymphknoten während DSS-induzierter Colitis: Das Vorkommen von Makrophagen und DC, sowie der Aldehyd-Dehydrogenasen 1 und 2 wurden in mesenterischen Lymphknoten von HIF-1 $\alpha^{+/+}$ - und LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren mittels qPCR mit Primern für *f4/80*, *cd11c*, *aldh1a1* und *aldh1a2* quantitativ erfasst. Dargestellt sind die Kontrollgruppen (C) und die für 4, 5 und 6 Tage DSS-behandelten Gruppen (4d, 5d, 6d DSS). Die *f4/80* (A) und *aldh1a2* (D) Expression zeigte in Proben der HIF-1 $\alpha^{+/+}$ - und LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere keine deutlichen Unterschiede. Die *cd11c* (B) sowie die *aldh1a1* (C) Expressionen waren zu allen Zeitpunkten der DSS-Behandlung in Proben der HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere erhöht. C: n=5. DSS: n=6.

Die *aldh1a1* Expression zeigte ein ähnliches Bild wie die *cd11c* Expression. Auch hier war die Expression in Proben der HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere zu allen Zeitpunkten der DSS-Behandlung signifikant um das ca. 1,5-4-fache erhöht, wohingegen die Proben der LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere zu keiner Zeit der DSS-Behandlung eine Erhöhung der *aldh1a1* Expression zeigten (siehe Abbildung 4.31 C).

Die *aldh1a2* Expression zeigte zu allen Zeitpunkten der DSS-Behandlung nur sehr geringe Schwankungen (siehe Abbildung 4.31 D).

Das Vorkommen von regulatorischen T-Zellen und dem anti-inflammatorischen Zytokin IL-10 wurde ebenfalls mittels qPCR in RNA aus mesenterischen Lymphknoten nachgewiesen.

Hierbei zeigte sowohl die *foxp3* als auch die *il-10* Expression zu allen Zeitpunkten der DSS-Behandlung einer Erhöhung in Proben der HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere, welche signifikant war im Vergleich zu den Proben der Kontrolltiere und der LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere, welche zu keiner Zeit der DSS-Behandlung eine deutliche Erhöhung der *foxp3* oder *il-10* Expression zeigten (siehe Abbildung 4.32).

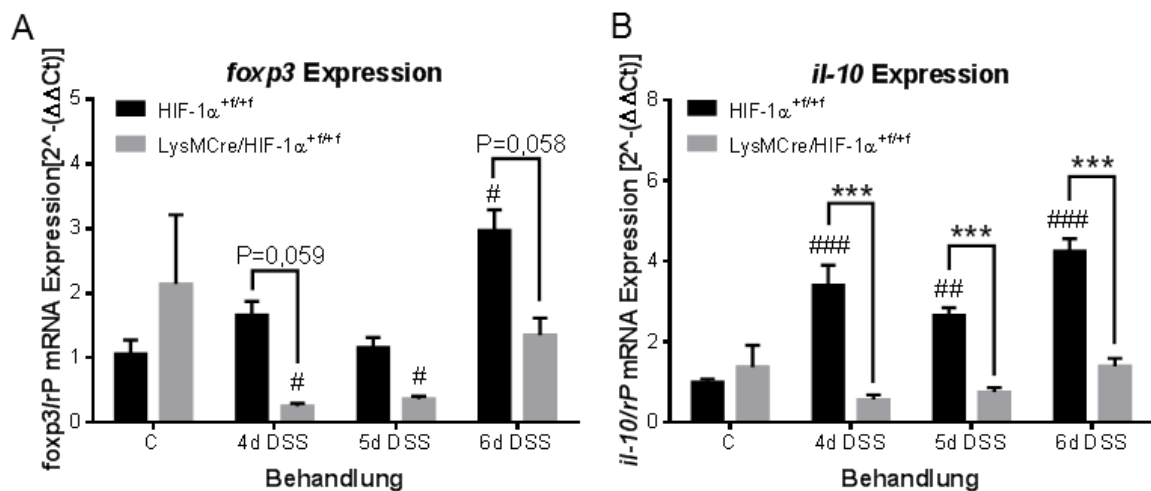


Abbildung 4.32 T_{reg} im Verlauf der DSS-induzierten Colitis: Das Vorkommen von T_{reg} und IL-10 wurde in mesenterischen Lymphknoten von HIF-1 $\alpha^{+/+}$ - und LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren mittels qPCR mit Primern für *foxp3* und *il-10* quantitativ erfasst. Dargestellt sind die Kontrollgruppen (C) und die für 4, 5 und 6 Tage DSS-behandelten Gruppen (4d, 5d, 6d DSS). Die *foxp3* (A) und *il-10* (B) Expression war zu allen Zeitpunkten der DSS-Behandlung in Proben der HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere erhöht. C: n=5. DSS: n=6.

5 Diskussion

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) sind durch sich kontinuierlich verschlechternde klinische Krankheitsbilder gekennzeichnet. Sie sind zur Zeit nicht vollständig therapierbar und es bedarf deshalb weiterhin umfassender Forschung, um neue Therapiemöglichkeiten entwickeln zu können.

Makrophagen bilden die größte Gruppe der intestinalen Leukozyten und es gibt bereits Hinweise, dass HIF eine wichtige Rolle für die Funktion und Aktivität von Makrophagen spielt. Außerdem konnte bereits gezeigt werden, dass HIF-Aktivität in Epithelzellen, T-Zellen und DC während CED protektiv ist. Daher war es Ziel dieser Arbeit den Einfluss von HIF-1 α auf die Funktion von Makrophagen während CED zu untersuchen.

5.1 Milderer Krankheitsbild der DSS-induzierten Colitis ohne myeloisches HIF-1 α

Um die Zell-spezifische Beteiligung von HIF-1 α in Makrophagen während DSS-induzierter Colitis zu untersuchen, wurde das *Cre/loxP*-System verwendet.

Zu Beginn dieser Arbeit wurde der erfolgreiche *Knock-out* von HIF-1 α verifiziert. Hierzu wurden BMDM aus HIF-1 $\alpha^{+/+}$ - und LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren differenziert und hypoxisch stimuliert. Durch qPCR wurde die Expression von Exon 2 des HIF-1 α Gens auf mRNA-Level untersucht. Mit Hilfe des *Cre/loxP*-Systems konnte ein ca. 80 %iger *Knock-out* von HIF-1 α in BMDM erzielt werden. Dieser Wert ist vergleichbar mit der *Knock-out* Effizienz, die Clausen et al. mit dem *Cre/loxP*-System erzielen konnten (Clausen et al., 1999). Hier zeigten reife Makrophagen eine ca. 83-98 %ige Reduzierung des von *loxP*-sites flankierten Zielgens. Granulozyten, zu denen unter anderem Neutrophile zählen, zeigten eine nahezu 100 %ige *Knock-out* Effizienz. Aus der Milz gewonnene dendritische Zellen zeigten hingegen nur eine ca. 16 %ige Reduzierung des von *loxP*-sites flankierten Zielgens (Clausen et al., 1999). Somit konnte für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche angenommen werden, dass hauptsächlich Makrophagen und Neutrophile durch das *Cre/loxP*-System und die Verwendung der Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Lyz2 Promoters von einem verkürzten und somit funktionslosem HIF-1 α Protein betroffen sein würden.

Die für diese Arbeit gewählte DSS-induzierte Colitis ist ein reproduzierbares Modell zur Untersuchung der akuten CED mit Symptomen wie Diarrhö und okkulten Blutungen, welche dem Krankheitsverlauf der akuten CED des Menschen sehr ähnelt (Okayasu et al., 1990). Da die DSS-induzierte Colitis durch die Infiltration von Granulozyten charakterisiert ist und auch in T-Zell-, B-Zell- und NK-defizienten Tieren induziert werden konnte (Axelsson et al., 1996; Dieleman et al., 1994), stellt sie ein sinnvolles Modell zur Untersuchung des angeborenen Immunsystems dar.

Die weit verbreitete Vorgehensweise zur Induktion einer Colitis in Mäusen mit einem C57BL/6-Hintergrund ist die Verabreichung von 3 % DSS für 5-7 Tage (Melgar et al., 2005; Vowinkel et al., 2004). Arbeitsgruppen-interne Erfahrungen (Dissertation Flück, 2014) zeigten jedoch eine zu starke Ausprägung der DSS-induzierten Colitis, um Unterschiede im DAI und dem Histologie-Score beobachten zu können. Deshalb wurde für die Induktion einer Colitis in dieser Arbeit eine geringere DSS-Konzentration gewählt und somit eine Versuchsdurchführung etabliert, durch die es möglich war Unterschiede zwischen HIF-1 $\alpha^{+/+}$ - und LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren zu untersuchen. In später erschienenen Publikationen wurden ebenfalls entsprechende DSS-Konzentrationen gewählt, um Unterschiede zwischen verschiedenen Gruppen beobachten zu können (Masterson et al., 2015). Es wurden mindestens 10 Wochen alte HIF-1 $\alpha^{+/+}$ - und LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere mit 2,5 % DSS für 4-6 Tage behandelt um eine Colitis zu induzieren.

Der Beginn der Gewichtsabnahme nach 4 Tagen DSS-Behandlung ist vergleichbar mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe Song et al., welche ebenfalls DSS-induzierte Colitis in C57BL/6-Mäusen untersuchte. Die Tiere in diesem Versuch erreichten jedoch erst nach 9 Tagen DSS-Behandlung einen vergleichbaren maximalen Gewichtsverlust von ca. 20 %, die Forscher setzten jedoch auch eine geringere DSS-Konzentration (1 %) ein (Song et al., 2015). Die auch in dieser Arbeit auftretende leichte Gewichtszunahme in den ersten Tagen der DSS-Verabreichung kann je nach verwendetem DSS und Mausstamm normal sein (Chassaing et al., 2014).

Die DSS-induzierte Colitis zeigte ein abgemildertes Krankheitsbild in LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren mit reduziertem Gewichtsverlust (Abbildung 4.2), weniger stark ausgeprägtem DAI (Abbildung 4.3) und geringerem Histologie-Score (Abbildung 4.8). Der Krankheitsverlauf der HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere war im Gewichtsverlust

und DAI vergleichbar mit den Ergebnissen von Xu et al., welche ebenfalls C57BL/6-Mäuse mit 2,5 % DSS für 7 Tage behandelten (Xu et al., 2008). Auch die Expression von *Icn-2*, welche als Marker für die Ausprägung der CED verwendet wird, war zu allen Zeitpunkten der DSS-Verabreichung in den HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren und lediglich nach 6 Tagen DSS-Behandlung auch bei den LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren erhöht (Abbildung 4.29). Die Verkürzung der Colon-Länge in Folge der DSS-Behandlung zeigte jedoch keine Unterschiede zwischen HIF-1 $\alpha^{+/+}$ - und LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren (Abbildung 4.6). Auch bei der Milz konnten keine Veränderungen in Größe oder Gewicht nach DSS-Behandlung beobachtet werden, weder in HIF-1 $\alpha^{+/+}$ - noch in LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren (Abbildung 4.4, Abbildung 4.5). Andere Arbeitsgruppen konnten jedoch mit höheren DSS-Konzentrationen (4 & 5 %) in C57BL/6-Mäusen eine deutliche Gewichtszunahme und Vergrößerung der Milz (Splenomegalie) beobachten, welche in Folge einer systemischen Entzündung und/oder des Blutverlusts durch rektale Blutungen zustande kommt (Chassaing et al., 2012; Snider et al., 2009). Eine stark ausgeprägte systemische Erkrankung kann bei unseren Versuchen deshalb ausgeschlossen werden.

5.2 Protektive Rolle von Mucinen bei CED und ihre Abhängigkeit von HIF-1 α

Da Mucine die erste schützende Barriere des Magen-Darm-Trakts bilden und bereits gezeigt werden konnte, dass der *Knock-out* von *muc-2* zur Ausbildung einer spontanen Colitis führt (Van der Sluis et al., 2006), wurden die Expression von *muc-2* und das Vorkommen von MUCIN-2 im Colongewebe untersucht. Hier zeigte sich eine erhöhte *muc-2* Expression und ein erhöhtes Vorkommen von MUCIN-2 nach 6 Tagen DSS-Behandlung (Abbildung 4.12, Abbildung 4.13), was vergleichbar mit den Ergebnissen von Dharmani et al. ist, welche jedoch Ratten mit 5 % DSS für 9 Tage behandelten. Diese konnten ebenfalls zu Beginn der DSS-induzierten Colitis eine starke Erhöhung der *muc-2* Expression beobachten (Dharmani et al., 2011).

Die *muc-3* Expression war zu allen Zeitpunkten der DSS-Behandlung ausschließlich in Proben der HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere erhöht (Abbildung 4.12). Eine Beteiligung von HIF-1 auf die Expression von *muc-3* wurde bereits in Epithelzellen untersucht. Hier wurde ebenfalls eine Erhöhung der Expression während DSS-

induzierter Colitis und außerdem eine Beteiligung von HIF-1 an der *muc-3* Expression beschrieben (Dharmani et al., 2011; Louis et al., 2006). Für unseren experimentellen Ansatz bleibt festzuhalten, dass in Abhängigkeit von HIF-1 in myeloischen Zellen (noch zu identifizierende) Faktoren gebildet werden, die die *muc-3* Expression im Darmepithel und damit den Schutz des Epithels regulieren.

5.3 Zunahme von Hypoxie und HIF-1 α -Akkumulation während CED

Neben der physiologischen Gewebe-Hypoxie, die im Darm aufgrund des anoxischen Darmlumens vorzufinden ist, sind viele entzündliche Krankheiten wie rheumatoide Arthritis und CED durch das Auftreten von Hypoxie charakterisiert (Furuta et al., 2001; Hu et al., 2014; Taylor & Colgan, 2007); daher war es auch Ziel dieser Arbeit Hypoxie im Colongewebe nachzuweisen.

Die physiologische und Entzündungs-assoziierte Gewebe-Hypoxie konnte mit Hilfe der *Hypoxyprobe*-Färbung im Colongewebe visualisiert werden (Abbildung 4.10). Hier konnte, wie schon Taylor & Colgan berichteten, ein steiler Sauerstoff-Gradient vom anoxischen Darmlumen hin zum gut durchbluteten Darmgewebe beobachtet werden. Nur die *Lamina epithelialis mucosae* zeigte in Tieren der Kontrollgruppe eine *Hypoxyprobe*-positive Färbung. Bei den DSS-behandelten Tieren war eine *Hypoxyprobe*-positive Färbung in der gesamten *Tunica mucosa* festzustellen. Diese Entzündungs-assoziierte Gewebe-Hypoxie kann zumindest zum Teil durch die massive Infiltration von Immunzellen in das entzündliche Gewebe und den dadurch gesteigerten Sauerstoffverbrauch erklärt werden (Taylor & Colgan, 2007).

Da im Colongewebe von MC und CU Patienten deutlich vermehrt HIF-1 α -positive Zellkerne in der *Lamina propria mucosae* lokalisiert werden konnten (Higashiyama et al., 2012), wurde in dieser Arbeit ebenfalls eine HIF-1 α -Färbung durchgeführt. Hier waren HIF-1 α -gefärbte Zellkerne im Colongewebe der Kontrolltiere nur vereinzelt und ausschließlich in der *Lamina epithelialis mucosae* lokalisiert. Im Colongewebe der DSS-behandelten Tiere war dagegen eine massiv erhöhte Anzahl HIF-1 α -positiver Zellkerne in der gesamten *Tunica mucosa* festzustellen (Abbildung 4.11). Diese Beobachtung konnten ebenfalls Saijo et al. machen, welche ebenfalls HIF-1 α -gefärbte Zellkerne zu Beginn der DSS-Verabreichung (Tag 0, Kontrolltiere) in der *Lamina epithelialis mucosae* und zu einem späteren

Zeitpunkt der DSS-Behandlung auch in der *Tunica mucosa* identifizierten (Saijo et al., 2015).

Die *Hypoxyprobe*-Färbung legt deshalb nahe, dass größte Veränderungen im Schweregrad der Hypoxie in den Immunzellen in der *Tunica mucosa* zu erwarten sind. Während die *Lamina epithelialis mucosae* des Darms aufgrund der intestinalen Anoxie immer Hypoxie-positiv gefärbt wurde, traten *Hypoxyprobe*- und HIF-1 α -positive Zellen bei DSS-induzierter Colitis vor allem in der *Tunica mucosa* vermehrt auf. Daher ist auch am ehesten eine HIF-1-abhängige Aktivierung der Genexpression in diesen Zellen zu erwarten.

5.4 Reduzierter Schweregrad der DSS-induzierten Colitis aufgrund verminderter Immunzellrekrutierung

CED sind durch eine massive Akkumulation von Neutrophilen, Makrophagen und DC in intestinales Gewebe charakterisiert. Bei der DSS-induzierten Colitis zeigte sich für Makrophagen (*f4/80*), Neutrophile (*cd177*), DC (*cd11c*) und T-Zellen (*cd4*) eine erhöhte Expression ausschließlich in HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren. Die LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere, welche einen abgemilderten Colitisverlauf aufwiesen, zeigten erst nach 6 Tagen DSS-Behandlung eine leicht erhöhte Anzahl dieser Immunzellen im Colon (Abbildung 4.15, Abbildung 4.19, Abbildung 4.20, Abbildung 4.21). Ähnliche Ergebnisse zeigten Marshall et al. durch Verwendung eines CSF-1-Antikörpers. CSF-1 spielt eine Rolle bei der Differenzierung, Proliferation, Aktivierung und Migration von Makrophagen. Die Verabreichung dieses Antikörpers führte zu einer abgemilderten Ausprägung der DSS-induzierten Colitis mit reduziertem Gewichtsverlust, verminderter Gewebeschädigung und einer reduzierten Infiltration von T-Zellen und Makrophagen. (Marshall et al., 2007). Der Verlust von HIF-1 in myeloischen Zellen könnte eine ähnliche Wirkung erzeugen, da HIF-1 ebenfalls eine Rolle bei der Aggregation, Motilität, Invasion und Phagozytose-Aktivität von Granulozyten (u.a. Neutrophile), Monozyten und Makrophagen spielt (Cramer et al., 2003).

Die DSS-Behandlung führte zu einer deutlichen Erhöhung der Anzahl an Makrophagen im Colongewebe beider Tiergruppen. In LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren war die Anzahl F4/80-positiver Zellen jedoch vermindert (Abbildung 4.17). Eine Erhöhung der Anzahl F4/80-positiver Zellen im Colongewebe nach DSS-Behandlung konnten ebenfalls Xu et al. zeigen. Hier wurden ebenfalls Mäuse mit

einem C57BL/6-Hintergrund mit 2,5 % DSS für 7 Tage behandelt (Xu et al., 2008). Die verminderte Infiltration von Makrophagen nach DSS-Behandlung in Colongewebe von LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -Tieren könnte auf die verminderte Motilität von Makrophagen aufgrund des fehlenden HIF-1 zurückzuführen sein. Cramer et al. konnten eine um 75 % verminderte Motilität von Makrophagen unter hypoxischen Bedingungen darstellen, wenn funktionelles HIF-1 fehlte (Cramer et al., 2003). Auch Scheerer et al. stellten eine verminderte Fähigkeit der Invasion von Makrophagen in LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -Tieren fest. Hier wurde ein Muskeltrauma-Modell untersucht und die Infiltration von Makrophagen in den Muskel ebenfalls durch F4/80-Färbung visualisiert (Scheerer et al., 2013).

Entgegengesetzt konnte eine andere Arbeitsgruppe jedoch zeigen, dass der *Knock-out* von CX3CR1 oder CX3CL1 zu einer Verminderung der Anzahl an Makrophagen in der *Lamina propria mucosae*, einer verstärkten Th17-Antwort und somit zu einer verstärkten DSS-induzierten Colitis führte. CX3CR1 und CX3CL1 werden in der Arbeit von Medina-Contreras et al. zum ersten Mal mit Makrophagen anstatt wie zuvor mit DC in Verbindung gebracht und als spezifische Marker für Makrophagen der *Lamina propria mucosae* identifiziert. Ob diese Chemokin/Rezeptor-Achse auch eine Bedeutung für die Migration von Makrophagen hat, ist bisher jedoch unklar (Medina-Contreras et al., 2011).

Retinsäure stellt einen wichtigen Modulator der intestinalen Immunreaktion dar, da sie in Kombination mit TGF β die DC- und Makrophagen-stimulierte Differenzierung von T_{reg} fördert (Denning et al., 2007), in hohen Konzentration in der Lage ist Th17 Differenzierung durch die Reduzierung von IFN γ und IL-17 zu unterdrücken (Elias et al., 2007) und durch die Induktion von $\alpha 4\beta 7$ auf der Oberfläche von T-Zellen zu einer zielgerichteten Rekrutierung dieser T-Zellen in intestinales Gewebe führt (Iwata et al., 2004). Die Konversion von Vitamin A zu Retinsäure erfordert ALDH1A1 oder ALDH1A2 auf DC und Makrophagen. Sanders et al. konnten zeigen dass ausschließlich intestinale Makrophagen und nicht DC in der Lage sind, *aldh1a1* zu exprimieren (Sanders et al., 2014). Arbeitsgruppen-interne Ergebnisse konnten zeigen, dass HIF-1 α exprimierende DC eine stärkere *aldh1a2* Expression aufweisen als HIF-1 α defiziente DC (Dissertation Flück, 2014). In der vorliegenden Arbeit konnte vor allem im Lymphknoten gezeigt werden, dass die Expression von *aldh1a1* ausschließlich in DSS-behandelten HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -Tieren erhöht war, obwohl die Anzahl der Makrophagen in beiden Tiergruppen vergleichbar war. Die

Expression von *aldh1a2* zeigte jedoch keine Unterschiede zwischen Behandlung und Tiergruppen, obwohl die Anzahl an DC ausschließlich in DSS-behandelten HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -Tieren erhöht war (Abbildung 4.31). Sanders et al. konnten zeigen, dass intestinale Makrophagen von MC Patienten eine erhöhte Expression von *aldh1a1* aufweisen und dies zu einer vermehrten Differenzierung von inflammatorischen Makrophagen führt (Sanders et al., 2014). Eine andere Arbeitsgruppe konnte des Weiteren eine hypoxische Induktion der *aldh1a1* Expression darstellen (Soehngen et al., 2014). Dies lässt vermuten, dass die verminderte Expression von *aldh1a1* in Lymphknoten von LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -Tieren auf den Verlust von HIF-1 α zurückzuführen ist und dies auch die verminderte Expression von *foxp3* in diesem Gewebe aufgrund der verminderten Retinsäure-abhängigen T_{reg} Differenzierung bedingt (Abbildung 4.32).

Neben der massiven Akkumulation von Immunzellen während CED ist auch eine veränderte Zytokin-Ausschüttung Ursache für die Krankheitsentstehung und ihren klinischen Verlauf. Einhergehend mit der erhöhten Anzahl verschiedener Immunzellen in DSS-behandelten HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -Tieren war auch eine verstärkte Expression inflammatorischer Zytokine. Die Expression von *tnfa*, *ifn γ* , *il-10*, *lcn-2*, *il-17a* und *tgfb β* , welche mittels qPCR untersucht wurde, war zu allen Zeitpunkten der DSS-Behandlung in HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -Tieren stark erhöht. LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -Tiere zeigten erst nach 6 Tagen DSS-Behandlung eine geringer ausgeprägte Induktion dieser Zytokine. Eine ähnliche Beobachtung konnten Yao et al. machen, welche DSS-induzierte Colitis in Kombination mit einer Resveratrol-Verabreichung untersuchten. Resveratrol führte dabei zu einer Reduzierung von HIF-1 α und zu einem abgemilderten Krankheitsbild der DSS-induzierten Colitis. Die Zytokine IL-6, IL-17, IL-10 und TGF β 1 waren in Resveratrol/DSS-behandelten Tieren geringer als in DSS-behandelten Tieren. Dies ging einher mit einer reduzierten Anzahl an Th17 und erhöhten Anzahl an T_{reg} (Yao et al., 2015). Die direkte Verknüpfung einer Reduzierung von HIF-1 α und dem verminderten Krankheitsbild ist jedoch mit Vorsicht zu betrachten, da Resveratrol ebenfalls eine generelle anti-inflammatorische Rolle zugesprochen wird (Yao et al., 2010). Somit könnte die Reduzierung von HIF-1 α mit einer verminderten Entzündung und einer daraus resultierenden verminderten Hypoxie zu begründen sein.

Ramanathan et al. konnten zeigen, dass HIF-1 α defiziente Makrophagen keine Veränderung der *il-10* Expression und sogar eine verstärkte *tnfa* Expression

aufweisen im Vergleich zu HIF-1 α exprimierende Makrophagen (Ramanathan et al., 2009). Somit sind die in dieser Arbeit beobachteten verminderten Expressionen von *il-10* und *tnfa* mit großer Wahrscheinlichkeit auf die reduzierte Anzahl an Makrophagen und weiteren Immunzellen wie Neutrophilen und DC in LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -Tieren zurückzuführen und nicht auf eine Beteiligung von HIF-1 an der Expression dieser Zytokine.

Vor allem das pro-inflammatorische Zytokin TNF α wurde schon früh in Verbindung mit der Entstehung von CED gebracht (Kollias et al., 1999). In darauf folgenden Untersuchungen führte die Verabreichung des TNF α -Antikörpers Infliximab zu einer dramatischen Reduktion der CED-assoziierten Entzündung und einer Wiederherstellung der intestinalen Barriere beim MC Patienten. Diese Arbeitsgruppe zeigte, dass vor allem die Verbesserung der Barriereintegrität zu diesem verbesserten Krankheitsbild führte (Suenart et al., 2002). Eine verminderte Barriereintegrität während CED kommt durch pro-inflammatorische Zytokine wie TNF α und IFN γ zustande, welche in der Lage sind *tight junctions* zu verändern und Apoptose von intestinalen Epithelzellen zu induzieren (Neurath, 2014). In der vorliegenden Arbeit war die *tnfa* Expression zu allen Zeitpunkten der DSS-Behandlung ausschließlich in HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -Tieren stark induziert. In LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -Tieren, welche eine mildere Ausprägung der DSS-induzierten Colitis zeigten, war die *tnfa* Expression erst nach 6 Tagen DSS-Behandlung und zu einem viel geringeren Ausmaß erhöht (Abbildung 4.26). Hauptsächlich Makrophagen sind an der Ausschüttung von TNF α beteiligt, auch wenn andere Immunzellen wie Neutrophile und DC und auch Epithelzellen zur TNF α Ausschüttung fähig sind (Schiwon et al., 2014). Da in DSS-behandelten LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -Tieren sowohl geringere Zahlen an Makrophagen als auch an Neutrophilen und DC vorzufinden waren, könnte dies Ursache für eine verminderte TNF α Ausschüttung sein und somit zu einer reduzierten Ausprägung der DSS-induzierten Colitis in diesen Tieren führen. Da HIF-1 α eine Rolle bei der Migration und Rekrutierung von Immunzellen spielt (Cramer et al., 2003), würde HIF-1 α zumindest eine indirekte Beteiligung an der starken *tnfa* Expression in DSS-behandelten HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -Tieren bzw. an der verminderten *tnfa* Expression in LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -Tieren zukommen.

5.5 Das adaptive Immunsystem während CED

T-Zellen spielen eine Schlüsselrolle in der adaptiven Immunreaktion. Um eine effektive Immunantwort hervorzurufen differenzieren sie nach einer Antigenpräsentation zu einer von drei Typen von T-Effektorlymphozyten (zytotoxische T-Zellen, Th, T_{reg}). Eine fehlregulierte adaptive Immunreaktion wird in engen Kontakt mit CED gebracht. Hier können eine massive Zytokin-Ausschüttung durch Th oder eine fehlerhafte anti-inflammatorische Regulation durch T_{reg} eine Rolle spielen (Wallace et al., 2014).

Die Expression von *cd8*, was unter anderem ein Marker für zytotoxische T-Zellen ist, zeigte in der DSS-induzierten Colitis zu keiner Zeit Unterschiede zwischen HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ - und LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -Tieren. Ein Marker für Th und T_{reg}, *cd4*, war jedoch zu allen Zeiten der DSS-Behandlung ausschließlich in HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -Tieren erhöht (Abbildung 4.21).

Th1 sind maßgeblich an der Elimination von intrazellulären Pathogenen beteiligt und schütten große Mengen IFN γ aus, was wiederum Makrophagen zur TNF α Ausschüttung stimuliert (Wallace et al., 2014). Die DSS-induzierte Colitis führte zwar zu einer Erhöhung der *ifn γ* Expression in beiden Tiergruppen, die jedoch in den HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -Tieren schon nach 4 und 5 Tagen DSS-Behandlung stark induziert war, während die LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -Tiere an diesen Tagen noch fast keine Induktion zeigten. Diese in den HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -Tieren erhöhte *ifn γ* Expression ging einher mit einer ebenso frühen und ähnlich starken Erhöhung der *tnf α* Expression (Abbildung 4.26). Ebenso konnte auf RNA-Level und immunhistochemisch eine stärkere Akkumulation von Makrophagen in DSS-behandelten HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -Tieren beobachtet werden (Abbildung 4.15, Abbildung 4.17).

Th17 sind charakterisiert durch die Ausschüttung von IL-17A, welches zur Rekrutierung von Neutrophilen und einer Erhöhung pro-inflammatorischer Faktoren wie iNOS und IL-1 β führt (Wallace et al., 2014). Die Expression von *il-17a* war zu allen Zeitpunkten der DSS-Behandlung in HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -Tieren massiv erhöht, in LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+f/+f}$ -Tieren hingegen erst nach 6 Tagen DSS-Behandlung (Abbildung 4.22). Dies war jedoch nicht vergleichbar mit der Expression des Neutrophilen-spezifischen Markers LY6G, welcher in beiden DSS-behandelten Gruppen erst an Tag 6 erhöht war (Abbildung 4.18). Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit denen von Hu et al., welche in einem Modell für rheumatoide Arthritis ebenfalls eine Erhöhung von Th1 und Th17 bei

Überexpression von HIF-1 α beobachten konnten. Dies ging einher mit einem pro-inflammatorischen Krankheitsbild mit vermehrter Ausschüttung von IFN γ und IL-17. Die Überexpression erfolgte hierbei mit Hilfe eines Plasmids in rheumatoiden synovialen Fibroblasten, welche aus Gewebe von Patienten mit rheumatoider Arthritis gewonnen wurden (Hu et al., 2014).

T_{reg} sind durch die Expression von *foxp3* charakterisiert und tragen zur Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase bei, indem sie Immunreaktionen gegen die Darm-eigenen Bakterien unterdrücken. Dies wird maßgeblich durch die Ausschüttung anti-inflammatorischer Zytokine wie IL-10 und TGF β bewirkt (Geremia et al., 2014). DSS-induzierte Colitis führte zu einer Erhöhung der *foxp3* Expression in beiden Tiergruppen, welche jedoch in LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren doppelt so stark erhöht war im Vergleich zu HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren (Abbildung 4.23). Auch die *tgfb* Expression zeigte in LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren eine stärkere Erhöhung nach 6 Tagen DSS-Behandlung (Abbildung 4.30). Die *il-10* Expression war dagegen zu allen Zeitpunkten der DSS-Behandlung ausschließlich in HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren erhöht (Abbildung 4.28).

Die Beteiligung von Th17, dem Th17-typischen Zytokin IL-17A und T_{reg} finden in der derzeitigen Erforschung von CED große Bedeutung. Vor allem das Verhältnis von Th17 zu T_{reg} scheint eine wichtige Rolle für die Ausprägung von Entzündungen zu spielen. Dabei fällt Th17 eine pro-inflammatorische und entzündungsbegünstigende Rolle zu und T_{reg} nehmen eine anti-inflammatorische und immuntolerante Rolle ein (Catana et al., 2015).

In dieser Arbeit zeigten HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tiere zu allen Zeitpunkten der DSS-Behandlung eine Erhöhung der *il-17a* Expression (Abbildung 4.22) und im Vergleich zu den LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren eine geringere Induktion der *foxp3* Expression, welche in den LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren an Tag 6 massiv erhöht war (Abbildung 4.23).

In *Lamina propria mucosae* Gewebeproben von CED Patienten konnte gezeigt werden, dass die Anzahl von Th17 und T_{reg} gegenüber Gesunden stark erhöht ist (Kobayashi et al., 2008; Makita et al., 2004). Dang et al. konnten zeigen, dass HIF-1 α in T-Zellen direkten Einfluss auf das Verhältnis von Th17 und T_{reg} hat. HIF-1 kann die Transkription von ROR γ t direkt induzieren. ROR γ t stellt wiederum den wichtigsten Transkriptionsfaktor für die Th17 Differenzierung dar. Somit kann HIF-1 α indirekt über ROR γ t die Th17 Differenzierung steigern. Entgegengesetzt reduziert HIF-1 α die T_{reg} Differenzierung durch die Bindung an FOXP3 und die

damit verbundene Markierung zur proteasomalen Degradation von FOXP3 (Dang et al., 2011). Clambey et al. konnten die HIF-1 α -abhängige Degradation von FOXP3 jedoch nicht bestätigen. Sie zeigten ebenfalls eine Hypoxie-induzierte Differenzierung von Th17, aber auch eine HIF-1 α -abhängige Induktion der *foxp3* Transkription während Hypoxie. So konnten Clambey et al. mehrere mögliche HRE in der Gensequenz von *foxp3* identifizieren und eine TGF β -abhängige und HIF-1 α -induzierte Erhöhung von FOXP3 auf mRNA- und Protein-Level feststellen (Clambey et al., 2012). Für die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lässt sich somit die Hypothese formulieren, dass der Verlust von myeloischem HIF-1 α die Differenzierung von pro-inflammatorischen T-Zellen wie Th1 und Th17 vermindert oder zumindest verzögert und die Differenzierung von anti-inflammatorischen T_{reg} begünstigt. Dies könnte Ursache für das abgemilderte Krankheitsbild der DSS-induzierten Colitis in LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren sein.

Neueste Erkenntnisse weisen jedoch darauf hin, dass T_{reg} unter pro-inflammatorischen Bedingungen in der Lage sind zu Th17 zu differenzieren, daraufhin doppelt positiv für die Marker IL-17 und FOXP3 sind und bis zu 60 % ihrer anti-inflammatorischen Funktion verlieren. Diese IL-17/FOXP3 doppelt positiven Zellen sind nahezu ausschließlich in Blutproben von CED Patienten vorzufinden (Hovhannisyan et al., 2011; Ueno et al., 2013).

Daher kann für die Ergebnisse der vorliegende Arbeit nicht abschließend festgestellt werden, ob es sich bei dem abgemilderten Krankheitsbild der DSS-induzierten Colitis in LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren um ein begünstigendes Verhältnis von Th17 zu T_{reg} handelt, oder ob auch IL-17/FOXP3 doppelt positive Zellen eine Rolle spielen. Hier sind weitere Versuche mit anschließenden Untersuchungen am Durchflusszytometer notwendig, um zwischen diesen verschiedenen T-Zell-Untergruppen differenzieren zu können.

Die wahrscheinlichste Annahme wäre jedoch, dass die verminderte Anzahl pro-inflammatorischer Zellen wie Th1 und Th17 auf die reduzierte Anzahl an Makrophagen in den LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren zurückzuführen ist. Dies wiederum ist mit dem Verlust von HIF-1 α und der damit verminderten Fähigkeit zur Migration und Invasion der Makrophagen zum Ort der Entzündung zu erklären. Somit könnte ein begünstigendes Verhältnis von anti-inflammatorischen zu pro-inflammatorischen Immunzellen in LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/+}$ -Tieren zu einer abgemilderten Ausprägung der DSS-induzierten Colitis führen.

5.6 HIF-1 als therapeutischer Angriffspunkt während CED

Die in dieser Arbeit dargestellte entzündungsfördernde Wirkung von myeloischem HIF-1 während DSS-induzierter Colitis könnte die Blockierung von myeloischem HIF-1 während CED als therapeutischen Angriffspunkt nahelegen. Jedoch ist die gezielte Blockierung in einem bestimmten Zelltyp durch Pharmaka schwer zu erreichen und eine globale HIF-Blockierung in allen Zelltypen könnte zu viele unerwünschte Nebenwirkungen zeigen. Denn die erste Studie, die einen therapeutisch relevanten Effekt von HIF während CED darstellen konnte, erzielte dies durch die Verabreichung eines Hydroxylase-Inhibitors (TRC160334). Die damit einhergehende globale Stabilisierung von HIF führte zu einer abgemilderten Ausprägung der DSS-induzierten Colitis, mit geringerem Verlust an Körpergewicht, reduziertem DAI und Colon Histologie Score und reduzierter Expression pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF α und IFN γ (Gupta et al., 2014). Außerdem konnten weitere Studien mit einem Zell-spezifischen *Knock-out* von HIF-1 α in Epithelzellen, T-Zellen oder DC ebenfalls eine protektive Wirkung von HIF-1 während DSS-induzierter Colitis feststellen (Flück et al., 2015; Higashiyama et al., 2012; Karhausen et al., 2004). Bei Karhausen et al. führte der Verlust von HIF-1 α in Epithelzellen zu einem schwereren Krankheitsbild der TNBS- und Oxazolone-induzierten Colitis mit erhöhtem Gewichtsverlust und erhöhter Sterblichkeit (Karhausen et al., 2004).

Auch der Verlust von HIF-1 α in T-Zellen führte zu einem intensivierten Krankheitsverlauf der DSS-induzierten Colitis. Das verstärkte Krankheitsbild ging dabei einher mit einer Erhöhung der *foxp3*, *il-10*, *il-6*, *il-17*, *ifn γ* , *tnfa* und *tgfb* Expression in Colon-mRNA der HIF-1 α -defizienten Tiere. Die protektive Rolle von HIF-1 in T-Zellen während DSS-induzierter Colitis wird hier mit dem Verhältnis von T_{reg} zu Th17 und der Beteiligung von HIF-1 auf die hypoxisch induzierte T_{reg}-Differenzierung begründet (Higashiyama et al., 2012). Dang et al. konnten jedoch eine Beteiligung von HIF-1 in T-Zellen bei der Th17-Differenzierung beobachten und zeigten, dass HIF-1 zu einem proteasomalen Abbau von FOXP3 führt und somit T_{reg}-Differenzierung verhindert (Dang et al., 2011).

Auch der Zell-spezifische *Knock-out* von HIF-1 α in DC führte zu einem verstärkten Krankheitsbild der DSS-induzierten Colitis mit erhöhtem Gewichtsverlust, erhöhten Spiegeln an inflammatorischen Zytokinen und einer verminderten Anzahl an T_{reg}

(Flück et al., 2015). In der Arbeit von Flück et al. wurde HIF-1 in DC ebenfalls eine Beteiligung an der Differenzierung von T_{reg} zugesprochen.

Lediglich Yao et al. konnten, wie schon in 5.4 erwähnt, eine ähnliche Beobachtung wie in der vorliegenden Arbeit machen (Yao et al., 2015). Hier führte die Verabreichung von Resveratrol während DSS-induzierter Colitis zu einer Reduktion von HIF-1 α und zu einem abgemilderten Krankheitsbild der DSS-induzierten Colitis. Die Verminderung von HIF-1 α resultierte ebenfalls in einer reduzierten Anzahl an Th17 und einer erhöhten Anzahl an T_{reg} (Yao et al., 2015), was in der hier vorliegenden Arbeit ebenfalls beobachtet werden konnte (Abbildung 4.22, Abbildung 4.23).

6 Zusammenfassung

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) stellen weiterhin eine Krankheit dar, von der mehr als 400.000 Menschen in Deutschland betroffen sind (Stand 2010) und für die es bislang keine Heilungsmöglichkeit gibt.

Es ist bereits bekannt, dass Entzündungen immer mit einem Mangel an Sauerstoff (Hypoxie) verbunden sind, und dass der Hypoxie-induzierbare Faktor-1 (HIF-1) eine protektive Rolle in verschiedenen Immunzellen (T-Zellen, DC) und Epithelzellen während CED spielt. Außerdem konnte bereits gezeigt werden, dass HIF-1 für verschiedene Funktionen von Makrophagen essenziell ist. Der Einfluss von HIF-1 in Makrophagen während CED wurde jedoch bisher noch nicht untersucht. Daher war es Ziel dieser Arbeit die Rolle von myeloischem HIF-1 während DSS-induzierter Colitis in der Maus zu untersuchen.

Nach erfolgreicher Verifizierung der *Knock-out* Effizienz von ca. 80 % wurden Tiere mit und ohne funktionelles HIF-1 α in Makrophagen für 4-6 Tage mit 2,5 % DSS behandelt um eine Colitis zu induzieren. Hier zeigten die HIF-1 α defizienten Tiere ein schwächer ausgeprägtes Krankheitsbild der DSS-induzierten Colitis mit reduziertem Gewichtsverlust und DAI und abgemilderter Colon-Gewebeschädigung. Einhergehend waren reduzierte Anzahlen verschiedener inflammatorischer Immunzellen wie Makrophagen, Neutrophile, DC und Th, wie auch verminderte Mengen inflammatorischer Zytokine wie TNF α und IFN γ .

Da HIF-1 α bekanntermaßen an der Motilität und Invasion von Makrophagen beteiligt ist, ist für die hier vorliegenden Ergebnisse anzunehmen, dass es in den HIF-1 α defizienten Tieren zu einer reduzierten Rekrutierung von Makrophagen ins entzündliche Colongewebe in Folge der DSS-induzierten Epithelschädigung gekommen ist. Folgend wurden dementsprechend reduzierte Mengen an Zytokinen ausgeschüttet und somit weniger weitere Immunzellen rekrutiert und aktiviert.

Des Weiteren konnte eine erhöhte Anzahl anti-inflammatorischer T_{reg} in HIF-1 α defizienten Tieren identifiziert werden. Dies könnte zu einem begünstigenden Verhältnis von anti-inflammatorischen T_{reg} zu inflammatorischen Th1/Th17 in den HIF-1 α defizienten Tieren beigetragen haben, wodurch in diesen Tieren ein abgemildertes Krankheitsbild zustande kam.

Die Ergebnisse dieser Arbeit erweitern bereits vorliegende Daten zur Rolle von HIF-1 α in Epithelzellen und Immunzellen wie T-Zellen und DC während Colitis.

Während eine HIF-Induktion in diesen Zellen eher protektive Effekte im Tiermodell vermuten ließ, deuten unsere Daten auf eine krankheitsfördernde Rolle von HIF-1 α in myeloischen Zellen hin. Eine Verabreichung von globalen HIF-Stabilisatoren zur therapeutischen Behandlung von CED ist daher kritisch zu prüfen, da HIF-1 durchaus konträre Rollen in den unterschiedlichen Zelltypen einnehmen kann.

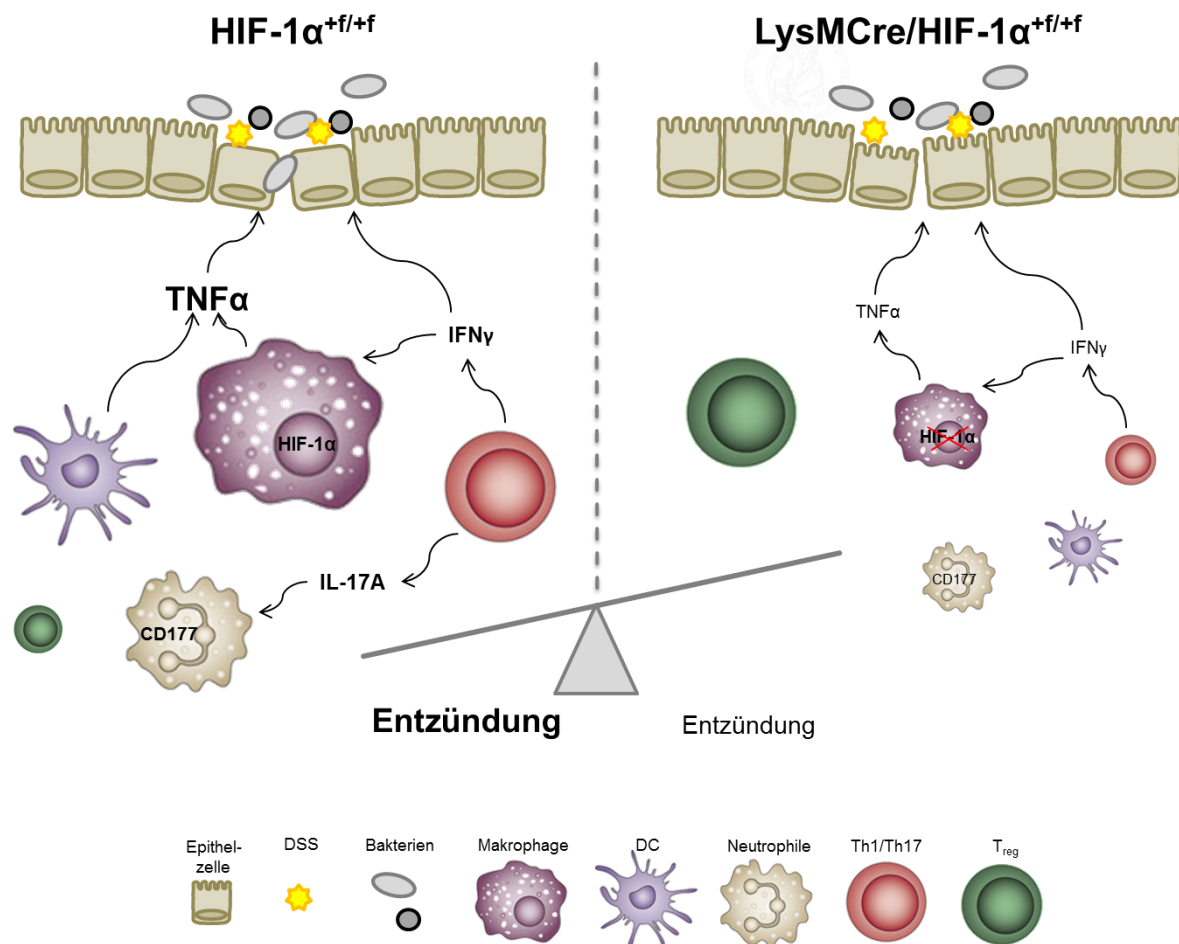


Abbildung 6.1 Die Rolle von myeloischem HIF-1 α für die Ausprägung einer DSS-induzierten Colitis: Tiere mit funktionellem HIF-1 α in myeloischen Zellen (HIF-1 $\alpha^{+/f/+f}$) reagierten mit starker Entzündung auf die DSS-induzierte Colitis. Sie zeigten eine große Zahl infiltrierter Immunzellen und folgend massive Ausschüttung inflammatorischer Zytokine wie TNF α , IFN γ und IL-17A (links). Tiere ohne funktionelles HIF-1 α in myeloischen Zellen (LysMCre/HIF-1 $\alpha^{+/f/+f}$) wiesen einen abgemilderten Krankheitsverlauf auf. In diesen Tieren waren reduzierte Anzahlen infiltrierter Immunzellen und weniger inflammatorische Zytokine aufzufinden. Dafür waren in diesen Tieren vermehrt antiinflammatorische Immunzellen (T_{reg}) nachzuweisen (rechts).

7 Abstract

Inflammatory bowel disease (IBD) still remains incurable and affects more than 400,000 people in Germany (as in 2010).

It is known that inflammation is related to an inappropriate oxygen supply (hypoxia) and hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) has a protective role in various immune cells (T cells, DC) and epithelial cells during IBD. Additionally it has been shown that HIF-1 is essential for various functions of macrophages. The impact of HIF-1 on macrophages during IBD still remains unknown. This prompted us to investigate the role of myeloid HIF-1 during DSS induced colitis.

Knockout of HIF-1 α in myeloid cells showed an efficiency of nearly 80 %. Animals with and without myeloid HIF-1 α were treated with 2.5 % DSS for 4-6 days to induce colitis. Mice deficient in myeloid HIF-1 α showed a milder DSS induced colitis with reduced weight loss and DAI and milder colon tissue damage. This was accompanied by reduced numbers of various inflammatory immune cells like macrophages, neutrophils, DC, and Th. This was accorded by diminished amounts of inflammatory cytokines like TNF α and IFN γ .

HIF-1 α is known to be involved in macrophage motility and invasion. The results of this study might rely on the fact that mice deficient in HIF-1 α showed a reduced recruitment of macrophages to sites of DSS-induced inflammation. Accordingly, reduced amounts of cytokines were released and therefore diminished numbers of further immune cells were recruited.

Furthermore HIF-1 α deficient mice showed increased numbers of anti-inflammatory T_{reg}. This could contribute to a beneficial balance between anti-inflammatory T_{reg} and inflammatory Th1/Th17 in HIF-1 α deficient mice and an attenuated DSS induced colitis in these mice.

The results of this study underline the pivotal role of HIF-1 α in epithelial cells and immune cells like T cells and DC during colitis. Whereas induction of HIF in these cells reveals a protective role during colitis, our results indicate a disease promoting role of myeloid HIF-1 α . Thus the systemic application of HIF-stabilizing PHD inhibitors in IBD should be considered with great care, because HIF-1 might act diversely in various cell types.

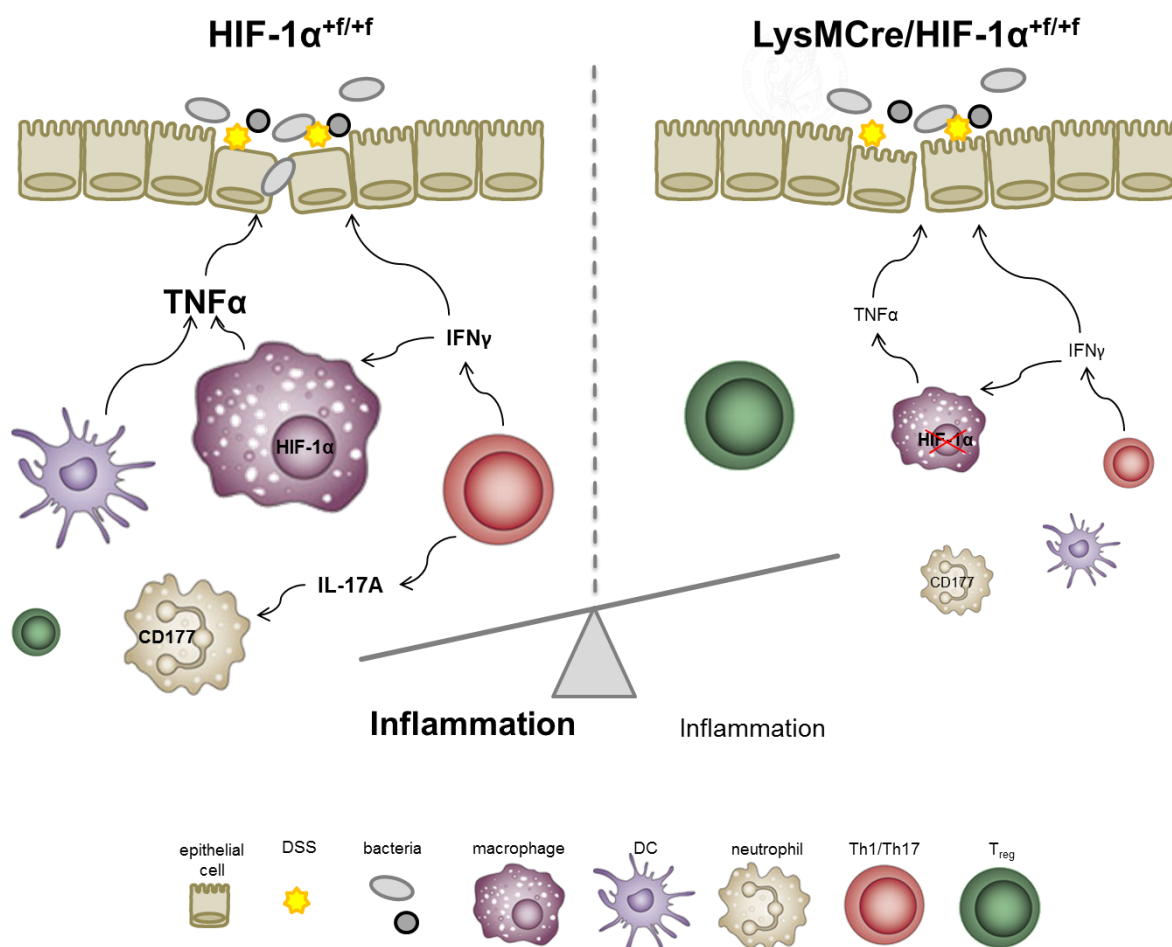


Figure 1 Role of myeloid HIF-1 α during DSS-induced colitis: Animals with functional HIF-1 α in myeloid cells (HIF-1 α ^{+/+}) displayed strong inflammation after DSS-induced colitis. They showed huge numbers of infiltrating immune cells and therefore high amounts of inflammatory cytokines like TNF α , IFN γ , and IL-17A (left). Animals without functional HIF-1 α in myeloid cells (LysMCre/HIF-1 α ^{+/+}) exhibited milder DSS-induced colitis. These mice had reduced numbers of infiltrated immune cells and less inflammatory cytokines. Instead anti-inflammatory immune cells (T_{reg}) were significantly increased (right).

8 Literaturverzeichnis

- Abraham, C., & Cho, J. H. (2009). Inflammatory bowel disease. *The New England Journal of Medicine*, 361(21), 2066–78.
- Anderson, C. a, Boucher, G., Lees, C. W., Franke, A., D'Amato, M., Taylor, K. D., Lee, J. C., Goyette, P., Imielinski, M., ... Rioux, J. D. (2011). Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nature Genetics*, 43(3), 246–252.
- Arteel, G. E., Thurman, R. G., & Raleigh, J. a. (1998). Reductive metabolism of the hypoxia marker pimonidazole is regulated by oxygen tension independent of the pyridine nucleotide redox state. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 253(3), 743–50.
- Atreya, R., Mudter, J., Finotto, S., Müllberg, J., Jostock, T., Wirtz, S., Schütz, M., Bartsch, B., Holtmann, M., Becker, C., Strand, D., Czaja, J., Schlaak, J. F., Lehr, H. a, Autschbach, F., Schürmann, G., Nishimoto, N., Yoshizaki, K., Ito, H., Kishimoto, T., Galle, P. R., Rose-John, S., & Neurath, M. F. (2000). Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nature Medicine*, 6(5), 583–588.
- Axelsson, L. G., Landström, E., Goldschmidt, T. J., Grönberg, A., & Bylund-Fellenius, a C. (1996). Dextran sulfate sodium (DSS) induced experimental colitis in immunodeficient mice: effects in CD4(+) -cell depleted, athymic and NK-cell depleted SCID mice. *Inflammation Research*, 45(4), 181–91.
- Bain, C. C., Scott, C. L., Uronen-Hansson, H., Gudjonsson, S., Jansson, O., Grip, O., Guillems, M., Malissen, B., Agace, W. W., & Mowat, a M. (2013). Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6Chi monocyte precursors. *Mucosal Immunology*, 6(3), 498–510.
- Bandarra, D., Biddlestone, J., Mudie, S., Muller, H. -a. J., & Rocha, S. (2014). HIF-1 restricts NF- B-dependent gene expression to control innate immunity signals. *Disease Models & Mechanisms*, 8(2), 169–181.
- Bandarra, D., & Rocha, S. (2013). Tale of two transcription factors : NF-kB and HIF crosstalk. *OA Molecular & Cell Biology*, 1, 1–7.
- Barthel, M., Hapfelmeier, S., Quintanilla-Martínez, L., Kremer, M., Rohde, M., Hogardt, M., Pfeffer, K., Rüßmann, H., & Hardt, W. D. (2003). Pretreatment of mice with streptomycin provides a Salmonella enterica serovar Typhimurium colitis model that allows analysis of both pathogen and host. *Infection and Immunity*, 71(5), 2839–2858.
- Bruick, R. K., & McKnight, S. L. (2001). A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5545), 1337–1340.
- Buell, M. G., & Berin, M. C. (1994). Neutrophil-independence of the initiation of colonic injury. Comparison of results from three models of experimental colitis in rat. *Digestive Diseases and Sciences*, 39(12), 2575–2588.
- Campbell, D. J., Kim, C. H., & Butcher, E. C. (2003). Chemokines in the systemic

- organization of immunity. *Immunological Reviews*, 195, 58–71.
- Carroll, V. a., & Ashcroft, M. (2006). Role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α versus HIF-2 α in the regulation of HIF target genes in response to hypoxia, insulin-like growth factor-I, or loss of von Hippel-Lindau function: Implications for targeting the HIF pathway. *Cancer Research*, 66(12), 6264–6270.
- Catana, C.-S., Berindan Neagoe, I., Cozma, V., Magdas, C., Tabaran, F., & Dumitrascu, D. L. (2015). Contribution of the IL-17/IL-23 axis to the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 21(19), 5823–5830.
- Chassaing, B., Aitken, J. D., Malleshappa, M., & Vijay-Kumar, M. (2014). Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Colitis in Mice. *Current Protocols in Immunology / Edited by John E. Coligan ... [et Al.]*, 104(February), 15.25.1–15.25.14.
- Chassaing, B., Srinivasan, G., Delgado, M. a, Young, A. N., Gewirtz, A. T., & Vijay-Kumar, M. (2012). Fecal lipocalin 2, a sensitive and broadly dynamic non-invasive biomarker for intestinal inflammation. *PloS One*, 7(9), e44328.
- Cho, J. H., & Brant, S. R. (2011). Recent insights into the genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 140(6), 1704–1712.
- Clambey, E. T., McNamee, E. N., Westrich, J. a, Glover, L. E., Campbell, E. L., Jedlicka, P., de Zoeten, E. F., Cambier, J. C., Stenmark, K. R., Colgan, S. P., & Eltzschig, H. K. (2012). Hypoxia-inducible factor-1 α -dependent induction of FoxP3 drives regulatory T-cell abundance and function during inflammatory hypoxia of the mucosa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(41), E2784–93.
- Clausen, B. E., Burkhardt, C., Reith, W., Renkawitz, R., & Förster, I. (1999). Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Research*, 8(4), 265–77.
- Cooper, H. S., Murthy, S. N., Shah, R. S., & Sedergran, D. J. (1993). Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 69(2), 238–49.
- Coskun, M. (2014). Intestinal epithelium in inflammatory bowel disease. *Frontiers in Medicine*, 1(August), 1–5.
- Cramer, T., Yamanishi, Y., Pawlinski, R., Mackman, N., Haase, V. H., Jaenisch, R., Corr, M., Nizet, V., Firestein, G. S., Gerber, H., Ferrara, N., & Johnson, R. S. (2003). HIF-1 α Is Essential for Myeloid Cell-Mediated Inflammation. *Cell*, 112(5), 645–657.
- Cummins, E., Seeballuck, F., & Keely, S. (2008). The hydroxylase inhibitor dimethyloxalylglycine is protective in a murine model of colitis. *Gastroenterology*, 134(1), 156–165.
- Daley, J. M., Thomay, A. a, Connolly, M. D., Reichner, J. S., & Albina, J. E. (2008). Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *Journal of Leukocyte Biology*, 83, 64–70.
- Danese, S., & Fiocchi, C. (2011). Ulcerative Colitis. *New England Journal of*

- Medicine*, 365(18), 1713–1725.
- Dang, E. V., Barbi, J., Yang, H.-Y., Jinasena, D., Yu, H., Zheng, Y., Bordman, Z., Fu, J., Kim, Y., Yen, H.-R., Luo, W., Zeller, K., Shimoda, L., Topalian, S. L., Semenza, G. L., Dang, C. V., Pardoll, D. M., & Pan, F. (2011). Control of T(H)17/T(reg) balance by hypoxia-inducible factor 1. *Cell*, 146(5), 772–84.
- Denning, T. L., Wang, Y., Patel, S. R., Williams, I. R., & Pulendran, B. (2007). Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses. *Nature Immunology*, 8(10), 1086–94.
- Dharmani, P., Leung, P., & Chadee, K. (2011). Tumor necrosis factor- α and Muc2 mucin play major roles in disease onset and progression in dextran sodium sulphate-induced colitis. *PloS One*, 6(9), e25058.
- Dieleman, L. A., Ridwan, B. U., Tennyson, G. S., Beagley, K. W., Bucy, R. P., & Elson, C. O. (1994). Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice. *Gastroenterology*, 107(6), 1643–52.
- Duester, G. (2000). Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function. Production of visual pigment and retinoic acid. *European Journal of Biochemistry*, 267(14), 4315–4324.
- Elias, K. M., Laurence, A., Davidson, T. S., Stephens, G., Kanno, Y., Shevach, E. M., & O'Shea, J. J. (2007). Retinoic acid inhibits Th17 polarization and enhances FoxP3 expression through a Stat-3/Stat-5 independent signaling pathway. *Blood*, 111(3), 1013–1020.
- Eltzschig, H. K., Bratton, D. L., & Colgan, S. P. (2014). Targeting hypoxia signalling for the treatment of ischaemic and inflammatory diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 13(11), 852–869.
- Fandrey, J. (2004). Oxygen-dependent and tissue-specific regulation of erythropoietin gene expression. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 286(6), R977–R988.
- Fandrey, J. (2007). Regulation der Sauerstoffhomöostase durch Hypoxie-induzierbaren Faktor-1. *Biospektrum*, 13(01.07), 26–28.
- Fandrey, J., Gorr, T. a, & Gassmann, M. (2006). Regulating cellular oxygen sensing by hydroxylation. *Cardiovascular Research*, 71(4), 642–51.
- Fantini, M. C., Becker, C., Tubbe, I., Nikolaev, a, Lehr, H. a, Galle, P., & Neurath, M. F. (2006). Transforming growth factor beta induced FoxP3+ regulatory T cells suppress Th1 mediated experimental colitis. *Gut*, 55(5), 671–680.
- Feagan, B. G., Greenberg, G. R., Wild, G., Fedorak, R. N., Paré, P., McDonald, J. W. D., Dubé, R., Cohen, A., Steinhart, a H., Landau, S., Aguzzi, R. a, Fox, I. H., & Vandervoort, M. K. (2005). Treatment of ulcerative colitis with a humanized antibody to the $\alpha 4\beta 7$ integrin. *The New England Journal of Medicine*, 352(24), 2499–2507.
- Flück, K. (2014). *Dissertation: Die Bedeutung des Hypoxie-induzierbaren Faktors 1 in dendritischen Zellen für die Pathophysiologie einer Dextrannatriumsulfat induzierten Colitis*. Universität Duisburg-Essen & Tierärztliche Hochschule Hannover.

- Flück, K., Breves, G., Fandrey, J., & Winning, S. (2015). Hypoxia-inducible factor 1 in dendritic cells is crucial for the activation of protective regulatory T cells in murine colitis. *Mucosal Immunology*.
- Frede, S., Stockmann, C., Freitag, P., & Fandrey, J. (2006). Bacterial lipopolysaccharide induces HIF-1 activation in human monocytes via p44/42 MAPK and NF- κ B. *Biochemical Journal*, 396(3), 517–527.
- Fujino, S., Andoh, A., Bamba, S., Ogawa, A., Hata, K., Araki, Y., Bamba, T., & Fujiyama, Y. (2003). Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut*, 52(1), 65–70.
- Furuta, G. T., Turner, J. R., Taylor, C. T., Hershberg, R. M., Comerford, K., Narravula, S., Podolsky, D. K., & Colgan, S. P. (2001). Hypoxia-inducible factor 1-dependent induction of intestinal trefoil factor protects barrier function during hypoxia. *The Journal of Experimental Medicine*, 193(9), 1027–1034.
- Geremia, A., Biancheri, P., Allan, P., Corazza, G. R., & Di Sabatino, A. (2014). Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. *Autoimmunity Reviews*, 13(1), 3–10.
- Giatromanolaki, a, Sivridis, E., Maltezos, E., Papazoglou, D., Simopoulos, C., Gatter, K. C., Harris, a L., & Koukourakis, M. I. (2003). Hypoxia inducible factor 1alpha and 2alpha overexpression in inflammatory bowel disease. *Journal of Clinical Pathology*, 56(3), 209–213.
- Grubbs, F. E. (1969). Procedures for Detecting Outlying Observations in Samples. *Technometrics*, 11(1), 1–21.
- Gumpert, N. Innere Medizin. unter https://www.dr-gumpert.de/html/morbus_crohn.html und https://www.dr-gumpert.de/html/colitis_ulcerosa.html (abgerufen im Dezember 2015).
- Gupta, R., Chaudhary, A. R., Shah, B. N., Jadhav, A. V, Zambad, S. P., Gupta, R. C., Deshpande, S., Chauthaiwale, V., & Dutt, C. (2014). Therapeutic treatment with a novel hypoxia-inducible factor hydroxylase inhibitor (TRC160334) ameliorates murine colitis. *Clinical and Experimental Gastroenterology*, 7, 13–23.
- Hackett, P., & Roach, R. (2001). High-Altitude Illness. *The New England Journal of Medicine*, 345(2), 107–14.
- Hansson, G. C. (2012). Role of mucus layers in gut infection and inflammation. *Current Opinion in Microbiology*, 15(1), 57–62.
- Hesse, M., Modolell, M., La Flamme, A. C., Schito, M., Fuentes, J. M., Cheever, A. W., Pearce, E. J., & Wynn, T. A. (2001). Differential Regulation of Nitric Oxide Synthase-2 and Arginase-1 by Type 1/Type 2 Cytokines In Vivo: Granulomatous Pathology Is Shaped by the Pattern of L-Arginine Metabolism. *The Journal of Immunology*, 167(11), 6533–6544.
- Higashiyama, M., Hokari, R., Hozumi, H., Kurihara, C., Ueda, T., Watanabe, C., Tomita, K., Nakamura, M., Komoto, S., Okada, Y., Kawaguchi, A., Nagao, S., Suematsu, M., Goda, N., & Miura, S. (2012). HIF-1 in T cells ameliorated dextran sodium sulfate-induced murine colitis. *Journal of Leukocyte Biology*, 91(6), 901–9.

- Hindryckx, P., Waeytens, A., Laukens, D., Peeters, H., Van Huysse, J., Ferdinande, L., Carmeliet, P., & De Vos, M. (2010). Absence of placental growth factor blocks dextran sodium sulfate-induced colonic mucosal angiogenesis, increases mucosal hypoxia and aggravates acute colonic injury. *Laboratory Investigation*, 90(4), 566–576.
- Hovhannisyan, Z., Treatman, J., Littman, D. R., & Mayer, L. (2011). Characterization of interleukin-17-producing regulatory T cells in inflamed intestinal mucosa from patients with inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 140(3), 957–965.
- Hu, F., Mu, R., Zhu, J., Shi, L., Li, Y., Liu, X., Shao, W., Li, G., Li, M., Su, Y., Cohen, P. L., Qiu, X., & Li, Z. (2014). Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 α provoke toll-like receptor signalling-induced inflammation in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 73(5), 928–36.
- Imtiyaz, H. Z., Williams, E. P., Hickey, M. M., Patel, S. A., Durham, A. C., Yuan, L., Hammond, R., Gimotty, P. A., Keith, B., & Simon, M. C. (2010). Hypoxia-inducible factor 2 α regulates macrophage function in mouse models of acute and tumor inflammation. *Journal of Clinical Investigation*, 120(8), 2699–2714.
- Ito, H., Takazoe, M., Fukuda, Y., Hibi, T., Kusugami, K., Andoh, A., Matsumoto, T., Yamamura, T., Azuma, J., Nishimoto, N., Yoshizaki, K., Shimoyama, T., & Kishimoto, T. (2004). A Pilot Randomized Trial of a Human Anti-Interleukin-6 Receptor Monoclonal Antibody in Active Crohn's Disease. *Gastroenterology*, 126(4), 989–996.
- Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, a, Asara, J. M., Lane, W. S., & Kaelin, W. G. (2001). HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science (New York, N.Y.)*, 292(5516), 464–468.
- Iwata, M., Hirakiyama, A., Eshima, Y., Kagechika, H., Kato, C., & Song, S.-Y. (2004). Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity*, 21(4), 527–38.
- Jantsch, J., Chakravorty, D., Turza, N., Prechtel, A. T., Buchholz, B., Gerlach, R. G., Volke, M., Gläsner, J., Warnecke, C., Wiesener, M. S., Eckardt, K.-U., Steinkasserer, A., Hensel, M., & Willam, C. (2008). Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 α modulate lipopolysaccharide-induced dendritic cell activation and function. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 180(7), 4697–705.
- Karhausen, J., Furuta, G. T., Tomaszewski, J. E., Johnson, R. S., Colgan, S. P., & Haase, V. H. (2004). Epithelial hypoxia-inducible factor-1 is protective in murine experimental colitis. *Journal of Clinical Investigation*, 114(8), 1098–1106.
- Karhausen, J., Haase, V. H., & Colgan, S. P. (2005). Inflammatory hypoxia: Role of hypoxia-inducible factor. *Cell Cycle*, 4(2), 256–258.
- Kobayashi, T., Okamoto, S., Hisamatsu, T., Kamada, N., Chinen, H., Saito, R., Kitazume, M. T., Nakazawa, A., Sugita, A., Koganei, K., Isobe, K., & Hibi, T. (2008). IL23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut*, 57(12), 1682–1689.

- Kolaczowska, E., & Kubes, P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews. Immunology*, 13(3), 159–75.
- Kollias, G., Douni, E., Kassiotis, G., & Kontoyiannis, D. (1999). On the role of tumor necrosis factor and receptors in models of multiorgan failure, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and inflammatory bowel disease. *Immunological Reviews*, 169(1), 175–194.
- Kong, T., Eltzschig, H. K., Karhausen, J., Colgan, S. P., & Shelley, C. S. (2004). Leukocyte adhesion during hypoxia is mediated by HIF-1-dependent induction of beta2 integrin gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 10440–10445.
- Kühl, A. a., Kakirman, H., Janotta, M., Dreher, S., Cremer, P., Pawlowski, N. N., Loddenkemper, C., Heimesaat, M. M., Grollich, K., Zeitz, M., Farkas, S., & Hoffmann, J. C. (2007). Aggravation of Different Types of Experimental Colitis by Depletion or Adhesion Blockade of Neutrophils. *Gastroenterology*, 133(6), 1882–1892.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–5.
- Lando, D., Peet, D. J., Whelan, D. a, Gorman, J. J., & Whitelaw, M. L. (2002). Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science (New York, N.Y.)*, 295(5556), 858–861.
- Louis, N. a, Hamilton, K. E., Canny, G., Shekels, L. L., Ho, S. B., & Colgan, S. P. (2006). Selective induction of mucin-3 by hypoxia in intestinal epithelia. *Journal of Cellular Biochemistry*, 99(6), 1616–27.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–75.
- Macdonald, T. T., & Monteleone, G. (2005). Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science (New York, N.Y.)*, 307(5717), 1920–1925.
- Makino, Y., Cao, R., Svensson, K., Bertilsson, G., Asman, M., Tanaka, H., Cao, Y., Berkenstam, a, & Poellinger, L. (2001). Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature*, 414(6863), 550–554.
- Makita, S., Kanai, T., Oshima, S., Uraushihara, K., Totsuka, T., Sawada, T., Nakamura, T., Koganei, K., Fukushima, T., & Watanabe, M. (2004). CD4+CD25bright T cells in human intestinal lamina propria as regulatory cells. *J Immunol*, 173(5), 3119–3130.
- Mann, E. R., & Li, X. (2014). Intestinal antigen-presenting cells in mucosal immune homeostasis: Crosstalk between dendritic cells, macrophages and B-cells. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 20(29), 9653–9664.
- Marshall, D., Cameron, J., Lightwood, D., & Lawson, A. D. G. (2007). Blockade of colony stimulating factor-1 (CSF-I) leads to inhibition of DSS-induced colitis. *Inflammatory Bowel Diseases*, 13(2), 219–24.
- Masterson, J. C., McNamee, E. N., Fillon, S. a., Hosford, L., Harris, R., Fernando, S. D., Jedlicka, P., Iwamoto, R., Jacobsen, E., Protheroe, C., Eltzschig, H. K.,

- Colgan, S. P., Arita, M., Lee, J. J., & Furuta, G. T. (2015). Eosinophil-mediated signalling attenuates inflammatory responses in experimental colitis. *Gut*, 64(8), 1236–1247.
- Matsuo, K., Lin, A., Procter, J. L., Clement, L., & Stroncek, D. (2000). Variations in the expression of granulocyte antigen NB1. *Transfusion*, 40(6), 654–662.
- Mecklenburgh, K. I., Walmsley, S. R., Cowburn, A. S., Wiesener, M., Reed, B. J., Upton, P. D., Deighton, J., Greening, A. P., & Chilvers, E. R. (2002). Involvement of a ferroprotein sensor in hypoxia-mediated inhibition of neutrophil apoptosis. *Blood*, 100(8), 3008–3016.
- Medina-Contreras, O., Geem, D., Laur, O., Williams, I. R., Lira, S. a., Nusrat, A., Parkos, C. a., & Denning, T. L. (2011). CX3CR1 regulates intestinal macrophage homeostasis, bacterial translocation, and colitogenic Th17 responses in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 121(12), 4787–4795.
- Melgar, S., Karlsson, A., & Michaelsson, E. (2005). Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 288(6), G1328–G1338.
- Monteleone, G., Kumberova, A., Croft, N. M., Mckenzie, C., Steer, H. W., & Macdonald, T. T. (2001). Blocking Smad7 restores TGF- β 1 signaling in chronic inflammatory bowel disease. *J. Clin. Invest.*, 108(4), 523–526.
- Mora, J. R., Bono, M. R., Manjunath, N., Weninger, W., Cavanagh, L. L., Roseblatt, M., & von Andrian, U. H. (2003). Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer's patch dendritic cells. *Nature*, 424(6944), 88–93.
- Mottet, C., Uhlig, H. H., & Powrie, F. (2003). Cutting Edge: Cure of Colitis by CD4+CD25+ Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology*, 170 (8), 3939–3943.
- Murai, M., Turovskaya, O., Kim, G., Madan, R., Karp, C. L., Cheroutre, H., & Kronenberg, M. (2009). Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. *Nature Immunology*, 10(11), 1178–1184.
- Murphy, K. M., Travers, P., & Walport, M. (2009). *Janeway Immunologie* (7th ed.). Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
- Naldini, A., Morena, E., Pucci, A., Miglietta, D., Riboldi, E., Sozzani, S., & Carraro, F. (2012). Hypoxia affects dendritic cell survival: role of the hypoxia-inducible factor-1 α and lipopolysaccharide. *Journal of Cellular Physiology*, 227(2), 587–595.
- Natsui, M., Kawasaki, K., Takizawa, H., Hayashi, S. I., Matsuda, Y., Sugimura, K., Seki, K., Narisawa, R., Sendo, F., & Asakura, H. (1997). Selective depletion of neutrophils by a monoclonal antibody, RP-3, suppresses dextran sulphate sodium-induced colitis in rats. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 12(12), 801–808.
- Neurath, M. F. (2014). Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Immunology*, 14(5), 329–342.
- Neurath, M. F., Fuss, I., Kelsall, B. L., Stüber, E., & Strober, W. (1995). Antibodies

- to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *The Journal of Experimental Medicine*, 182(5), 1281–1290.
- Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y., & Nakaya, R. (1990). A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology*, 98(3), 694–702.
- Open Stax College, R. U. (Ed.). (2013). *Anatomy & physiology*. Houston, Texas: OpenStax College.
- Perše, M., & Cerar, A. (2012). Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, 1–13.
- Powrie, F., Leach, M. W., Mauze, S., Caddie, L. B., & Coffman, R. L. (1993). Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. *International Immunology*, 5 (11), 1461–1471.
- Pull, S. L., Doherty, J. M., Mills, J. C., Gordon, J. I., & Stappenbeck, T. S. (2005). Activated macrophages are an adaptive element of the colonic epithelial progenitor niche necessary for regenerative responses to injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (1), 99–104.
- Qualls, J. E., Kaplan, A. M., Rooijen, N. Van, & Cohen, D. a. (2006). Suppression of experimental colitis by intestinal mononuclear phagocytes Abstract: The contribution of innate immunity to inflammatory bowel disease (IBD) remains an area. *Journal of Leukocyte Biology*, 80, 802–815.
- Ramanathan, M., Luo, W., Csóka, B., Haskó, G., Lukashev, D., Sitkovsky, M. V, & Leibovich, S. J. (2009). Differential regulation of HIF-1 α isoforms in murine macrophages by TLR4 and adenosine A(2A) receptor agonists. *Journal of Leukocyte Biology*, 86(3), 681–689.
- Rennick, D. M., Fort, M. M., & Davidson, N. J. (1997). Studies with IL-10 $^{-/-}$ mice: an overview. *Journal of Leukocyte Biology*, 61(4), 389–396.
- Roberts, P. J., Riley, G. P., Morgan, K., Miller, R., Hunter, J. O., & Middleton, S. J. (2001). The physiological expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the human colon. *Journal of Clinical Pathology*, 54 (4), 293–297.
- Rugtveit, J., Haraldsen, G., Høgåsen, A. K., Bakka, A., Brandtzaeg, P., & Scott, H. (1995). Respiratory burst of intestinal macrophages in inflammatory bowel disease is mainly caused by CD14+L1+ monocyte derived cells. *Gut*, 37 (3), 367–373.
- Rutgeerts, P. J., Fedorak, R. N., Hommes, D. W., Sturm, A., Baumgart, D. C., Bressler, B., Schreiber, S., Mansfield, J. C., Williams, M., Tang, M., Visich, J., Wei, X., Keir, M., Luca, D., Danilenko, D., Egen, J., & O'Byrne, S. (2013). A randomised phase I study of etrolizumab (rhuMAb b7) in moderate to severe ulcerative colitis. *Gut*, (62), 1122–1130.
- Saijo, H., Tatsumi, N., Arihiro, S., Kato, T., Okabe, M., Tajiri, H., & Hashimoto, H. (2015). Microangiopathy triggers, and inducible nitric oxide synthase exacerbates dextran sulfate sodium-induced colitis. *Laboratory Investigation*, 95(7), 728–748.

- Salim, S. Y., & Söderholm, J. D. (2011). Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. *Inflammatory Bowel Diseases*, 17(1), 362–381.
- Sanders, T. J., McCarthy, N. E., Giles, E. M., Davidson, K. L. M., Haltalli, M. L. R., Hazell, S., Lindsay, J. O., & Stagg, A. J. (2014). Increased production of retinoic acid by intestinal macrophages contributes to their inflammatory phenotype in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*, 146(5), 1278–88.e1–2.
- Sartor, R. B. (2006). Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nature Clinical Practice. Gastroenterology & Hepatology*, 3(7), 390–407.
- Scheerer, N., Dehne, N., Stockmann, C., Swoboda, S., Baba, H. a, Neugebauer, A., Johnson, R. S., & Fandrey, J. (2013). Myeloid Hypoxia-Inducible Factor-1 α Is Essential for Skeletal Muscle Regeneration in Mice. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*.
- Schiwon, M., Weisheit, C., Franken, L., Gutweiler, S., Dixit, A., Meyer-Schwesinger, C., Pohl, J.-M., Maurice, N. J., Thiebes, S., Lorenz, K., Quast, T., Fuhrmann, M., Baumgarten, G., Lohse, M. J., Opdenakker, G., Bernhagen, J., Bucala, R., Panzer, U., Kolanus, W., Gröne, H.-J., Garbi, N., Kastenmüller, W., Knolle, P. a, Kurts, C., & Engel, D. R. (2014). Crosstalk between sentinel and helper macrophages permits neutrophil migration into infected uroepithelium. *Cell*, 156(3), 456–68.
- Schofield, C. J., & Ratcliffe, P. J. (2004). Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 5(May), 343–354.
- Schütt, C., & Bröker, B. (2009). *Grundwissen Immunologie* (2nd ed.). Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
- Semenza, G. L. (1998). Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis. *Current Opinion in Genetics & Development*, 8(5), 588–594.
- Shah, Y. M., Ito, S., Morimura, K., Chen, C., Yim, S., Haase, V. H., & Gonzalez, F. J. (2008). Hypoxia-inducible factor augments experimental colitis through an MIF-dependent inflammatory signaling cascade. *Gastroenterology*, 134(7), 2036–48, 2048.e1–3.
- Snider, A. J., Kawamori, T., Bradshaw, S. G., Orr, K. A., Gilkeson, G. S., Hannun, Y. A., & Obeid, L. M. (2009). A role for sphingosine kinase 1 in dextran sulfate sodium-induced colitis. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 23(1), 143–52.
- Soehngen, E., Schaefer, A., Koeritzer, J., Huelsmeyer, V., Zimmer, C., Ringel, F., Gempt, J., & Schlegel, J. (2014). Hypoxia upregulates aldehyde dehydrogenase isoform 1 (ALDH1) expression and induces functional stem cell characteristics in human glioblastoma cells. *Brain Tumor Pathology*, 31(4), 247–56.
- Song, M.-Y., Hong, C.-P., Park, S. J., Kim, J.-H., Yang, B.-G., Park, Y., Kim, S. W., Kim, K. S., Lee, J. Y., Lee, S.-W., Jang, M. H., & Sung, Y.-C. (2015). Protective effects of Fc-fused PD-L1 on two different animal models of colitis. *Gut*, 64(2), 260–271.

- Stallmach, A., Häuser, W., L'hoest, H., & Marschall, U. (2012). *Beiträge und Analysen*. (U. Repschläger, C. Schulte, & N. Osterkamp, Eds.) *Gesundheitswesen aktuell 2012* (2012th ed.). Barmer GEK.
- Suenaert, P., Bulteel, V., Lemmens, L., Noman, M., Geypens, B., Assche, G. Van, Geboes, K., Ceuppens, J. L., & Rutgeerts, P. (2002). Anti-tumor necrosis factor treatment restores the gut barrier in Crohn's disease. *American Journal of Gastroenterology*, 97(8), 2000–2004.
- Tambuwalla, M., Cummins, E., & Lenihan, C. (2010). Loss of prolyl hydroxylase-1 protects against colitis through reduced epithelial cell apoptosis and increased barrier function. *Gastroenterology*, 139(6), 2093–2101.
- Taylor, C., & Colgan, S. (2007). Hypoxia and gastrointestinal disease. *Journal of Molecular Medicine*, 85(12), 1295–300.
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(9), 4350–4.
- Ueda, Y., Kayama, H., Jeon, S. G., Kusu, T., Isaka, Y., Rakugi, H., Yamamoto, M., & Takeda, K. (2010). Commensal microbiota induce LPS hyporesponsiveness in colonic macrophages via the production of IL-10. *International Immunology*, 22(12), 953–962.
- Ueno, A., Jijon, H., Chan, R., Ford, K., Hirota, C., Kaplan, G. G., Beck, P. L., Iacucci, M., Fort Gasia, M., Barkema, H. W., Panaccione, R., & Ghosh, S. (2013). Increased prevalence of circulating novel IL-17 secreting Foxp3 expressing CD4+ T cells and defective suppressive function of circulating Foxp3+ regulatory cells support plasticity between Th17 and regulatory T cells in inflammatory bowel disease patients. *Inflammatory Bowel Diseases*, 19(12), 2522–34.
- Valencia, X., Stephens, G., Goldbach-mansky, R., Wilson, M., Shevach, E. M., & Lipsky, P. E. (2006). TNF downmodulates the function of human CD4+ CD25 hi T-regulatory cells. *Immunobiology*, 108(1), 253–261.
- Van der Sluis, M., De Koning, B. a E., De Bruijn, A. C. J. M., Velcich, A., Meijerink, J. P. P., Van Goudoever, J. B., Büller, H. a, Dekker, J., Van Seuningen, I., Renes, I. B., & Einerhand, A. W. C. (2006). Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology*, 131(1), 117–29.
- van Hogezaand, R. a, Eichhorn, R. F., Choudry, a, Veenendaal, R. a, & Lamers, C. B. H. W. (2002). Malignancies in inflammatory bowel disease: fact or fiction? *Scandinavian Journal of Gastroenterology. Supplement*, 552 1(236), 48–53.
- van Uden, P., Kenneth, N. S., & Rocha, S. (2008). Regulation of hypoxia-inducible factor-1a by NF-κB. *Biochemical Journal*, 412(Pt 3), 477–484.
- Vowinkel, T., Kalogeris, T. J., Mori, M., Krieglstein, C. F., & Granger, D. N. (2004). Impact of dextran sulfate sodium load on the severity of inflammation in experimental colitis. *Digestive Diseases and Sciences*, 49(4), 556–564.
- Wallace, K. L., Zheng, L.-B., Kanazawa, Y., & Shih, D. Q. (2014). Immunopathology of inflammatory bowel disease. *World Journal of*

- Gastroenterology* : WJG, 20(1), 6–21.
- Walmsley, S. R., Cadwallader, K. A., & Chilvers, E. R. (2005). The role of HIF-1 α in myeloid cell inflammation. *Trends in Immunology*.
- Walmsley, S. R., Print, C., Farahi, N., Peyssonnaud, C., Johnson, R. S., Cramer, T., Sobolewski, A., Condliffe, A. M., Cowburn, A. S., Johnson, N., & Chilvers, E. R. (2005). Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1 α -dependent NF-kappaB activity. *The Journal of Experimental Medicine*, 201(1), 105–15.
- Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. a., & Semenza, G. L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(12), 5510–5514.
- Wennemuth, G. (2012). *Taschenatlas Histologie*. München: Urban & Fischer in Elsevier.
- Winer, J., Jung, C. K., Shackel, I., & Williams, P. M. (1999). Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Analytical Biochemistry*, 270(1), 41–9.
- Wobben, R., Hüsecken, Y., Lodewick, C., Gibbert, K., Fandrey, J., & Winning, S. (2013). Role of hypoxia inducible factor-1 α for interferon synthesis in mouse dendritic cells. *Biological Chemistry*, 394(4), 495–505.
- Xavier, R. J., & Podolsky, D. K. (2007). Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, 448(7152), 427–34.
- Xie, Q., Klesney-Tait, J., Keck, K., Parlet, C., Borcherdig, N., Kolb, R., Li, W., Tygrett, L., Waldschmidt, T., Olivier, A., Chen, S., Liu, G.-H., Li, X., & Zhang, W. (2015). Characterization of a novel mouse model with genetic deletion of CD177. *Protein & Cell*, 6(2), 117–126.
- Xu, Y., Hunt, N. H., & Bao, S. (2008). The role of granulocyte macrophage-colony-stimulating factor in acute intestinal inflammation. *Cell Research*, 18(12), 1220–9.
- Xue, X., Ramakrishnan, S., Anderson, E., Taylor, M., Zimmermann, E. M., Spence, J. R., Huang, S., Greenson, J. K., & Shah, Y. M. (2013). Endothelial PAS domain protein 1 activates the inflammatory response in the intestinal epithelium to promote colitis in mice. *Gastroenterology*, 145(4), 831–41.
- Yao, J., Cheng, W., Jian-Yao, W., Ru, Z., Ying-Xue, L., & Li-Sheng, W. (2015). Effect of resveratrol on Treg/Th17 signaling and ulcerative colitis treatment in mice. *World Journal of Gastroenterology*, 21(21), 6572.
- Yao, J., Wang, J.-Y., Liu, L., Li, Y.-X., Xun, A.-Y., Zeng, W.-S., Jia, C.-H., Wei, X.-X., Feng, J.-L., Zhao, L., & Wang, L.-S. (2010). Anti-oxidant effects of resveratrol on mice with DSS-induced ulcerative colitis. *Archives of Medical Research*, 41(4), 288–94.
- Zeissig, S., Bürgel, N., Günzel, D., Richter, J., Mankertz, J., Wahnschaffe, U., Kroesen, a J., Zeitz, M., Fromm, M., & Schulzke, J.-D. (2007). Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight

- junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut*, 56, 61–72.
- Zhang, R., Ito, S., Nishio, N., Cheng, Z., Suzuki, H., & Isobe, K. (2011). Up-regulation of Gr1+CD11b+ population in spleen of dextran sulfate sodium administered mice works to repair colitis. *Inflammation & Allergy Drug Targets*, 10(1), 39–46.
- Zigmond, E., Bernshtein, B., Friedlander, G., Walker, C. R., Yona, S., Kim, K. W., Brenner, O., Krauthgamer, R., Varol, C., Müller, W., & Jung, S. (2014). Macrophage-restricted interleukin-10 receptor deficiency, but not IL-10 deficiency, causes severe spontaneous colitis. *Immunity*, 40(5), 720–733.
- Zilles, K., & Tillmann, B. N. (2010). *Anatomie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
%ig/%iges	prozentig/prozentiges
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
AOM	Azoxymethan
APS	Ammoniumpersulfat
bHLH	basisches Helix-Loop-Helix
BMDM	Knochenmarksmakrophagen (engl. <i>bone marrow derived macrophages</i>)
bp	Basenpaare (engl. <i>base pairs</i>)
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Kontrolle (engl. <i>control</i>)
ca.	cirka
CAD	C-terminale Transaktivierungsdomäne
CCR	CC Chemokin Rezeptor
CD	Nomenklatur für Zelloberflächenmoleküle (engl. <i>cluster of differentiation</i>)
cDNA	komplementäre DNA (engl. <i>complementary DNA</i>)
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankung
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CT	Schwellenwert-Zyklus (engl. <i>cycle threshold</i>)
CU	Colitis ulcerosa
d	Tage (engl. <i>days</i>)
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAI	(engl. <i>disease activity index</i>)
DAPI	4,6-Diamidin-2-phenylindol
DC	dendritische Zelle (engl. <i>dendritic cell</i>)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMOG	Dimethyloxalylglycin

DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>desoxyribonucleic acid</i>)
DSS	Dextrannatriumsulfat (engl. <i>dextran sodium sulfate</i>)
dT	Desoxythymidine
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenbis(oxyethylnitrilo)-tetraessigsäure
engl.	englisch
EtOH	Ethanol
FCS	Kälberserum (engl. <i>fecal calf serum</i>)
FIH	HIF-inhibierender Faktor (engl. <i>Factor Inhibiting HIF</i>)
FOXP3	Forkhead-Box-Protein P3
g	Gramm
GALT	darmassoziiertes lymphatisches Gewebe (engl. <i>gut-associated lymphoid tissue</i>)
GTC	Guanidinthiocyanat
h	Stunde (engl. <i>hour</i>)
H&E	Hämatoxylin und Eosin
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor
HOX	Hypoxie
HRE	Hypoxie-responsive Elemente
IBD	CED (engl. <i>inflammatory bowel disease</i>)
IFN	Interferon
IL	Interleukin
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LCN	Lipocalin
LPS	Lipopolysaccharid
M	molar
max.	maximal
MC	Morbus Crohn
M-CSF	Monozytenkolonien-stimulierender Faktor (engl. <i>macrophage colony-stimulating factor</i>)
mg/ml	Milligramm pro Milliliter

MHC	Haupthistokompatibilitätskomplexes (engl. <i>major histocompatibility complex</i>)
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimol
mRNA	(engl. <i>messenger RNA</i>)
MUC	Mucin
Na ₂ HPO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NFκB	engl. <i>nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells</i>
NGS	normales Ziegenserum (engl. <i>normal goat serum</i>)
NK	natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
NOX	Normoxie
NP40	Nonidet® P40
NTP	Nukleosidtriphosphate
O ₂	Sauerstoff
ODD	O ₂ -sensitive Abbau-Domäne (engl. <i>oxygen-dependent degradation domain</i>)
PAMP	pathogenassoziierte molekulare Muster (engl. <i>pathogen-associated molecular patterns</i>)
PBS	Phosphat gepufferte Saline (engl. <i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PFA	Paraformaldehyd
PHD	Prolylhydroxylase
PRR	Mustererkennungsrezeptoren (engl. <i>pattern recognition receptors</i>)
qPCR	quantitative PCR
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i>)
rP	ribosomales Protein
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden

SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SEM	Standardfehler (engl. <i>standard error of mean</i>)
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris gepufferte Saline (engl. <i>tris buffered saline</i>)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TNBS	Trinitrobenzolsulfonsäure
TNF	Tumornekrosefaktor
T _{reg}	regulatorische T-Zelle
UV	Ultraviolett
U/ml	Units pro Milliliter
üN	über Nacht
VE	vollentsalztes
V	Volt
x	Mal
z.B.	zum Beispiel

9.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Ursachen der CED:	5
Abbildung 1.2 Aufbau des Magen-Darm-Trakts und der Darmwand:	6
Abbildung 1.3 Colitis ulcerosa und Morbus Crohn im Vergleich:	7
Abbildung 1.4 Differenzierung der Immunzellen:	10
Abbildung 1.5 Immunsystem des Darms:	12
Abbildung 1.6 Domänenstruktur von HIF-1 α und HIF-1 β :	16
Abbildung 1.7 Regulation der HIF- α Untereinheit durch PHDs und FIH:	17
Abbildung 1.8 HIF-Aktivität in Neutrophilen:	19
Abbildung 4.1 Nachweis der <i>Knock-out</i> Effizienz:	46
Abbildung 4.2 Gewichtsverlust im Krankheitsverlauf der DSS-induzierten Colitis:	48
Abbildung 4.3 DAI im Krankheitsverlauf der DSS-induzierten Colitis:	49
Abbildung 4.4 Makroskopischer Einfluss von DSS auf die Milz:	50
Abbildung 4.5 Mikroskopischer Befund der Milz:	51
Abbildung 4.6 Makroskopischer Einfluss von DSS auf das Colon:	52
Abbildung 4.7 Einfluss von DSS auf das Colongewebe:	53
Abbildung 4.8 Beurteilung der Colon-Schädigung:	54
Abbildung 4.9 Fibroseareale im Colon nach DSS-Behandlung:	56
Abbildung 4.10 Hypoxie im Colon der DSS-induzierten Colitis:	57
Abbildung 4.11 HIF-1 α im Colon der DSS-induzierten Colitis:	58
Abbildung 4.12 Die protektiven Mucine im Verlauf der DSS-induzierten Colitis: ..	59
Abbildung 4.13 Mucosale Protektion während DSS-induzierter Colitis:	61
Abbildung 4.14 Mucopolysaccharide und essigsäure Mucine im Colon während DSS-induzierter Colitis:	63
Abbildung 4.15 Makrophagen während DSS-induzierter Colitis:	64
Abbildung 4.16 Die Expression der Marker iNOS und ARG-1 zur Charakterisierung von Makrophagen während DSS-induzierter Colitis:	65
Abbildung 4.17 Das Vorkommen von Makrophagen während DSS-induzierter Colitis:	66
Abbildung 4.18 Neutrophile während DSS-induzierter Colitis:	67
Abbildung 4.19 Die Expression des Markers CD177 zur Charakterisierung von Neutrophilen während DSS-induzierter Colitis:	68
Abbildung 4.20 Dendritische Zellen während DSS-induzierter Colitis:	69
Abbildung 4.21 T-Zellen während DSS-induzierter Colitis:	70

Abbildung 4.22 Die Expression des Th17-spezifischen Zytokins IL-17A während DSS-induzierter Colitis:	71
Abbildung 4.23 T _{reg} während DSS-induzierter Colitis:	72
Abbildung 4.24 Das Vorkommen von T _{reg} während DSS-induzierter Colitis:	73
Abbildung 4.25 Auswertung der FOXP3-Färbung:	74
Abbildung 4.26 Die Zytokine TNF α und IFN γ im Verlauf der DSS-induzierten Colitis:	75
Abbildung 4.27 Das pro-inflammatorische Zytokin IL-6 im Verlauf der DSS-induzierten Colitis:	76
Abbildung 4.28 Das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 im Verlauf der DSS-induzierten Colitis:	77
Abbildung 4.29 Lipocalin-2 im Verlauf der DSS-induzierten Colitis:	78
Abbildung 4.30 TGF β 1 im Verlauf der DSS-induzierten Colitis:	79
Abbildung 4.31 Immunzellen und Retinsäure in mesenterischen Lymphknoten während DSS-induzierter Colitis:	81
Abbildung 4.32 T _{reg} im Verlauf der DSS-induzierten Colitis:	82
Abbildung 6.1 Die Rolle von myeloischem HIF-1 α für die Ausprägung einer DSS-induzierten Colitis:	97

9.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1 Bezeichnung und Herstellerangabe der verwendeten Geräte	22
Tabelle 2.2 Verwendete Verbrauchsmaterialien	24
Tabelle 2.3 Verwendete Chemikalien und Reagenzien	25
Tabelle 2.4 Verwendete Puffer und Lösungen	28
Tabelle 2.5 Antikörper für Western Blot	30
Tabelle 2.6 Antikörper für Immunhistochemie	30
Tabelle 2.7 Primersequenz, Produktlänge und Annealing-Temperatur	31
Tabelle 3.1 DAI Punkteaufteilung	33
Tabelle 3.2 Histologischer Score	41
Tabelle 3.3 Verwendete Verdünnungen von Erst- und Zweitantikörpern für Fluoreszenz-Färbungen	44

9.4 Publikationsliste

Poster

1. **Reichmann V.**, Flück K., Lodewick C., Fandrey J., Winning S. (2013). Myeloid Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 and HIF-2 in Inflammatory Bowel Disease. 92nd Annual Meeting, Deutsche Physiologische Gesellschaft, Heidelberg, Abstractband S.167.
2. **Reichmann V.**, Flück K., Lodewick C., Fandrey J., Winning S. (2013). Myeloid Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 and HIF-2 in Inflammatory Bowel Disease. Annual Retreat of DFG Graduate Training Program GRK 1431, Ostbevern, Abstractband S.37.
3. **Reichmann V.**, Flück K., Lodewick C., Fandrey J., Winning S. (2013). Myeloid Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 in Inflammatory Bowel Disease. 12. Forschungstag der Medizinischen Fakultät, Essen, Abstractband S.106.
4. **Reichmann V.**, Fandrey J., Winning S. (2014). Myeloid Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 Inflammatory Bowel Disease. Joint Annual Retreat of DFG Graduate Training Program GRK 1431 and BIOME 'Cell Biology and Genetics' Core, Mülheim an der Ruhr, Abstractband S.40.
5. **Reichmann V.**, Fandrey J., Winning S. (2014). Myeloid Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 in Inflammatory Bowel Disease. 28th Annual European Macrophage and Dendritic Cell Society Conference, Wien, Österreich, Abstractband S.48.
6. **Reichmann V.**, Fandrey J., Winning S. (2014). Myeloid Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 in Inflammatory Bowel Disease. 3. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Mukosale Immunologie und Mikrobiom, Essen.
7. **Reichmann V.**, Fandrey J., Winning S. (2014). Myeloid Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 in Inflammatory Bowel Disease. 13. Forschungstag der Medizinischen Fakultät, Essen, Abstractband S.119.
8. **Reichmann V.**, Fandrey J., Winning S. (2015). Loss of myeloid Hypoxia-Inducible Factor-1 ameliorates Dextran Sodium Sulfate induced colitis in mice. 94th Annual Meeting, Deutsche Physiologische Gesellschaft, Magdeburg, Abstractband S.77.

9. **Reichmann V.**, Fandrey J., Winning S. (2015). Loss of myeloid Hypoxia-Inducible Factor-1 ameliorates Dextran Sodium Sulfate induced colitis in mice. Keystone Symposia ‚Hypoxia: From Basic Mechanisms to Therapeutics‘, Dublin, Irland, Abstractband S.100.

10. **Reichmann V.**, Fandrey J., Winning S. (2015). Loss of myeloid Hypoxia-Inducible Factor-1 ameliorates Dextran Sodium Sulfate induced colitis in mice. 17. International Congress of Mucosal Immunology, Berlin, Abstractband S.122.

11. **Reichmann V.**, Fandrey J., Winning S. (2015). Loss of myeloid Hypoxia-Inducible Factor-1 ameliorates Dextran Sodium Sulfate induced colitis in mice. 14. Forschungstag der Medizinischen Fakultät, Essen, Abstractband S.109.

9.5 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

9.6 Danksagung

Die Danksagung ist aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Erklärungen

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 abs. (2) f) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie und Geografie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Der Einfluss des Hypoxie-induzierbaren Faktor-1 in myeloischen Zellen auf entzündliche Darmerkrankungen“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Veronika Reichmann befürworte und die Betreuung auch im Falle eines Weggangs, wenn nicht wichtige Gründe dem entgegenstehen, weiterführen werde.

Essen, den _____
Prof. Dr. J. Fandrey

Erklärungen

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) c) + e) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie und Geografie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den _____
Veronika Reichmann

Erklärungen

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) d) + f) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie und Geografie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, den _____
Veronika Reichmann